

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO *PASSIFLORA*
(*PASSIFLORACEAE*), DE LA REGIÓN NORTE DEL ECUADOR POR
MEDIO DEL MÉTODO DNA BARCODING**

AUTOR:

JORGE EDUARDO MIÑO DOMÍNGUEZ

TUTOR:

MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS

Quito, septiembre de 2018

Cesión de derechos de autor

Yo Jorge Eduardo Miño Domínguez con documento de identificación N° 1713119285 manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud que soy el autor del trabajo de titulación denominado “IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO *PASSIFLORA* (PASSIFLORACEAE), DE LA REGIÓN NORTE DEL ECUADOR POR MEDIO DEL MÉTODO DNA BARCODING”, mismo que ha sido desarrollado para optar el título de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana facultada para acceder plenamente los derechos de autor

En aplicación a lo determinado por la Ley de Propiedad Intelectual en mi condición de autor me reservo los derechos morales de esta obra. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana



Jorge Eduardo Miño Domínguez

1713119285

Quito, septiembre de 2018

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación
“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO PASSIFLORA
(PASSIFLORACEAE), DE LA REGIÓN NORTE DEL ECUADOR POR MEDIO
DEL MÉTODO DNA BARCODING”, realizado por Jorge Eduardo Miño Domínguez
con documento de identificación N° 17131195285, obteniendo un producto que
cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana
para ser considerado como trabajo final de titulación

Quito, septiembre de 2018



.....

Marco Fernando Cerna Cevallos

C.I. 0501872071

Dedicatoria

“Las metas, son el camino hacia tus sueños; pero no se pueden lograr sin disciplina y consistencia”.

Denzel Washintong

A Dios por ser una guía brindarme, la fortaleza, sabiduría.

A mis padres Jorge Miño y Mónica Domínguez quienes me han guiado por el buen camino, por el esfuerzo que no me falte nada, y gracias a ello soy mejor persona día a día.

A mi hermana Dyana Miño que siempre estuvo conmigo, y no me dejó caer en los momentos adversos.

Agradecimientos

A mi tutor Ph.D. Marco Cerna por darme la oportunidad de ser parte del grupo de investigación NUNKUI WAKAN; siempre brindándome una mano solidaria frente a las adversidades, junto con sus conocimientos y confianza se logró realizar este trabajo.

Agradezco al grupo de investigación NUNKUI WAKAN por su cooperación y apoyo infinito

A los ayudantes del CIVABI, por su amistad y colaboración en el desarrollo de este trabajo.

Índice

| | |
|---|---|
| Introducción | 1 |
| Capítulo I..... | 3 |
| Marco Teórico | 3 |
| 1.1. Generalidades de la familia <i>Passifloraceae</i> | 3 |
| 1.2. Distribución del género <i>Passiflora</i> en el Ecuador | 3 |
| 1.3. Cultivo | 4 |
| 1.4. Descripción botánica del género <i>Passiflora</i> | 4 |
| 1.4.1. Raíz | 4 |
| 1.4.2. Tallo | 5 |
| 1.4.3. Zarcillos..... | 5 |
| 1.4.4. Hoja..... | 6 |
| 1.4.5. Flor | 6 |
| 1.4.6. Fruto | 6 |
| 1.4.7. Semilla | 6 |
| 1.5. Plantas medicinales | 7 |
| 1.6. Propiedades terapéuticas del género <i>Passiflora</i> | 7 |
| 1.7. Usos del género <i>Passiflora</i> | 7 |
| 1.8. Plantas tóxicas | 8 |
| 1.9. Reportes de intoxicación en el Ecuador causadas por el género <i>Passiflora</i> .. | 8 |
| 1.10. DNA barcoding | 8 |
| 1.11. Técnicas moleculares..... | 9 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 1.12. | Identificación molecular | 9 |
| 1.13. | Extracción de ADN en plantas | 10 |
| 1.14. | Electroforesis | 10 |
| 1.15. | Reacción en cadena de la Polimerasa PCR | 11 |
| 1.16. | Marcadores moleculares | 12 |
| 1.16.1. | <i>matK</i> | 12 |
| 1.16.2. | <i>rcbL</i> | 12 |
| 1.17. | Secuenciación | 13 |
| 1.17.1. | Técnica de Sanger | 13 |
| 1.17.2. | Análisis bioinformáticos | 14 |
| 1.18. | Análisis de secuencias | 14 |
| 1.18.1. | Revisión de bibliotecas moleculares | 14 |
| 1.18.2. | Blast (Basical Logical Alignment Search Tool) | 15 |
| 1.18.3. | Identificación en bibliotecas moleculares | 15 |
| 1.18.4. | Boldsystem | 15 |
| 1.18.5. | Herramienta de identificación en boldsystem | 15 |
| 1.19. | Filogenia | 16 |
| 1.19.1. | Construcción de árboles filogenéticos | 16 |
| 1.19.2. | Árboles filogenéticos | 16 |
| Capítulo II | | 18 |
| Metodología | | 18 |
| 2.1 | Manejo de ejemplares en el Herbario Nacional del Ecuador QCNE | 18 |
| 2.2 | Colección de plantas al azar | 18 |

| | | |
|------------------------------|---|----|
| 2.3 | Extracción de ADN | 19 |
| 2.4 | Visualización del ADN extraído por medio de electroforesis horizontal.... | 20 |
| 2.5 | Amplificación | 22 |
| 2.6 | Secuenciación | 22 |
| 2.7 | Análisis y validación de secuencias | 23 |
| 2.8 | Consulta de base de datos en Boldsystems | 23 |
| 2.9 | Construcción del árbol filogenético | 23 |
| Capítulo III..... | | 25 |
| Resultados y Discusión | | 25 |
| 3.1 | Colección de especies..... | 25 |
| 3.1.1 | Identificación, descripción morfológica, fitoquímica y usos | 26 |
| a) | <i>Passiflora edulis</i> Sims | 26 |
| b) | <i>Passiflora ligularis</i> Juss | 27 |
| c) | <i>Passiflora mixta</i> L.f. | 28 |
| d) | <i>Passiflora tripartita</i> (Juss.) Poir. | 30 |
| e) | <i>Passiflora quadrangularis</i> L. | 31 |
| f) | <i>Passiflora maliformis</i> L. | 32 |
| g) | <i>Passiflora caerulea</i> L. | 33 |
| h) | <i>Passiflora morifolia</i> Mast. | 34 |
| i) | <i>Passiflora ambigua</i> Hemsl. | 35 |
| j) | <i>Passiflora alata</i> Curtis. | 36 |
| k) | <i>Passiflora macrophylla</i> Spruce ex Mast. | 38 |
| l) | <i>Passiflora tryphostemmatoides</i> Harms..... | 39 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.1.2 | Georreferenciación..... | 40 |
| 3.2 | Identificación molecular..... | 44 |
| 3.2.1 | Extracción de ADN..... | 44 |
| 3.2.2 | Amplificación del segmento <i>matK</i> de las especies colectadas mediante la técnica PCR convencional. | 45 |
| 3.2.3 | Secuenciación de las especies colectadas | 46 |
| 3.2.4 | Análisis bioinformáticos | 46 |
| 3.2.5 | Identificación de secuencias por medio del software Blast y Boldsystems | 47 |
| 3.3 | Filogenia..... | 48 |
| 3.3.1 | Filogenia en base al marcador <i>matK</i> | 48 |
| 3.3.2 | Árbol Filogenético por medio del marcador <i>rbcL</i> | 50 |
| 3.3.3 | Árbol Filogenético concatenado los marcadores <i>matK</i> y <i>rbcL</i> | 52 |
| 4. | Conclusiones..... | 55 |
| 5. | Recomendaciones | 56 |
| 6. | Referencias..... | 57 |
| 7. | Anexos | 66 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Listado de las especies colectadas del género <i>Passiflora</i> para este estudio. | 25 |
| Tabla 2. Listado de las especies que no se encuentran en la zona de colección del género <i>Passiflora</i> para este estudio..... | 41 |
| Tabla 3. Resultados de identidad de especies colectadas..... | 47 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Escalera molecular O'Gener ruler | 21 |
| Figura 2 Escalera molecular TrackIt™ 100 bp DNA Ladder | 21 |
| Figura 3. Voucher de <i>Passiflora edulis</i> Sims..... | 27 |
| Figura 4. Voucher de <i>Passiflora ligularis</i> Juss | 28 |
| Figura 5. Voucher de <i>Passiflora mixta</i> L.f..... | 29 |
| Figura 6. Voucher de <i>Passiflora tripartita</i> (Juss) Poir..... | 30 |
| Figura 7. Voucher de <i>Passiflora quadrangularis</i> L. | 32 |
| Figura 8. Voucher de <i>Passiflora maliformis</i> L. | 33 |
| Figura 9. Voucher de <i>Passiflora caerulea</i> L..... | 34 |
| Figura 10. Voucher de <i>Passiflora morifolia</i> Mast. | 35 |
| Figura 11. Voucher de <i>Passiflora ambigua</i> Hemsl..... | 36 |
| Figura 12. Voucher de <i>Passiflora alata</i> Curtis. | 37 |
| Figura 13. Voucher de <i>macrophylla</i> Spruce ex Mast..... | 38 |
| Figura 14. Voucher de <i>Passiflora tryphostemmatoides</i> Harms | 40 |
| Figura 15. Distribución geográfica de especies del género <i>Passiflora</i> presentes en la zona norte del Ecuador..... | 41 |
| Figura 16. Electroforesis del ADN total de las especies colectadas del género <i>Passiflora</i> | 45 |
| Figura 17. Gel electroforético del producto PCR del segmento <i>matK</i> , de especies colectadas del género <i>Passiflora</i> | 46 |
| Figura 18. Cromatograma de la muestra 3452 secuenciada..... | 47 |
| Figura 19 Árbol filogenético construido por el segmento <i>matK</i> | 49 |
| Figura 20 Árbol filogenético construido por el segmento <i>rbcL</i> | 51 |
| Figura 21. Árbol filogenético concatenado por los marcadores <i>matK</i> y <i>rbcL</i> | 53 |

Índice de anexos

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Tabla de resultados de la extracción de ADN y Amplificación del gen <i>matK</i> | 66 |
| Anexo 2. Tabla de resultados de Blastn del género <i>Passiflora</i> de especies colectadas | 67 |
| Anexo 3. Tabla de resultados de Boldsystems del género <i>Passiflora</i> de especies colectadas | 69 |
| Anexo 4. Análisis filogenético molecular de Passifloraceae (Malpighiales) basado en secuencias de ADN plastídicas y nucleares” Tokuoka, (2012)..... | 70 |
| Anexo 5. Filogenia, biogeografía y tiempos de divergencia en <i>Passiflora</i> Muschner, Zamberlan, Bonatto, y Freitas, (2012) | 71 |

Resumen

El nombre del género *Passiflora* quiere decir flor de la pasión, por otro lado este género tiene un alto interés económico debido al uso medicinal, alimenticio y ornamental de sus flores y frutos, en el Ecuador se tiene registros de 95 especies de este género, en esta investigación se colectaron al azar muestras de especies de este grupo presentes en la región norte del Ecuador en las provincias de: Pichincha, Santo Domingo, Napo, Tungurahua, Cotopaxi; en pisos altitudinales que van desde los 400 hasta los 2800 m.s.n.m, las muestras fueron identificadas a nivel de especie mediante comparación con vouchers del Herbario Nacional del Ecuador QCNE, para la identificación molecular se extrajo el ADN mediante el método de Doyle y Doyle, seguidamente se amplificó un segmento del gen *matK* mediante la técnica PCR convencional, los productos PCR fueron secuenciados mediante la técnica Sanger, las secuencias fueron analizadas con las herramientas Blast y Boldsytem para identificar a que especie corresponden, siendo Blast la mejor herramienta para identificación. A continuación se realizó un análisis filogenético utilizando los segmentos del gen *matK* y la información del segmento *rbcL* que está disponible en Genbank, se elaboraron 3 árboles uno por cada segmento y uno concatendando los árboles construidos por el segmento *matk* y el concatenado muestran similitud en la agrupación de especies en concordancia con la morfología, mientras que el segmento *rbcL* arrojó una diferencias en la distribución.

Palabras Clave: *Passiflora*, *matK*, *rbcL*, ADN Bardcoding

Abstract

The name of the genus *Passiflora* means flower of passion, on the other hand this genus has a high economic interest due to medicinal, nutritional and ornamental use of its flowers and fruits, in Ecuador there are records of 95 species of this genus, in this research samples of species of this group present in the northern region of Ecuador were collected at random in the provinces of: Pichincha, Santo Domingo, Napo , Tungurahua, Cotopaxi; in altitudinal floors ranging from 400 to 2800 meters above sea level, the samples were identified at the species level by comparison with vouchers of the National Herbarium of Ecuador QCNE, for the molecular identification the DNA was extracted by the Doyle y Doyle method, then amplified a segment of the *matK* gene by means of the conventional PCR technique, PCR products were sequenced using the Sanger technique, the sequences were analyzed with the Blast and Boldsystem tools to identify which species they correspond to, Blast being the best tool for identification. Next, a phylogenetic analysis was performed using the segments of the *matK* gene and the *rcbL* segment information that is available in Genbank, 3 trees were elaborated one for each segment and one concatenating the trees constructed by the *matK* segment and the concatenated one show similarity in the grouping of species in accordance with the morphology, while the segment *rbcL* showed a difference in the distribution.

Key words: *Passiflora*, *matK*, *rbcL*, ADN Bardcoding

Introducción

Para Freire (2004) y Cerón (2015) el género *Passiflora* es el más importante de la familia *Passifloraceae*, debido a su representatividad y al número de especies que agrupa, estas son nativas del Norte, Centro y Sur América, se distribuyen en zonas tropicales que llegan hasta los 3000 m.s.n.m.

De acuerdo con The plant List (2013), existen 534 nombres de especies aceptadas, con un grado de confiabilidad medio del 81,1 % y 18,9 % con bajo grado de confiabilidad, esto revela la necesidad de revisar el estatus de las especies con un sistema más eficiente como lo es el método DNA Barcoding, el cual utiliza segmentos estandarizados de ADN que tienen una variabilidad suficiente para discriminar a los individuos a nivel de especie.

Según Hansen, Gilbert y Jansen, (1999) en su estudio de “Origen y evolución del género *Passiflora*” mencionan que las especies de este género sufren múltiples hibridaciones debido a que estas se entrecruzan fácilmente y forman híbridos que no se han podido identificar siendo fundamental un análisis filogenético usando datos moleculares y con ello ver las relaciones de parentesco que estas presentan.

Por otro lado Krosnick, Ford, y Freudenstein (2009), mencionan que la identificación a nivel molecular resulta ser indispensable al momento de identificar especies pudiendo establecer nuevos datos taxonómicos; en la actualidad la técnica de DNA Barcoding se utiliza para determinar especies mediante el uso de segmentos de ADN cloroplástico que son *matK* y *rbcL*

Como lo menciona Jørgensen, Muchhala, y MacDougal (2012), el número de especies de este género se ha incrementado en las últimas décadas; es por eso que en este trabajo se ha planteado como objetivo principal la caracterización a nivel molecular de las especies del género *Passiflora*, presentes en la zona norte del Ecuador, mediante el uso del segmento *matK*, para justificar la publicación de nuevas especies o reagrupar aquellas que tienen diferencias morfológicas por su carácter híbrido.

Capítulo I

Marco Teórico

1.1. Generalidades de la familia *Passifloraceae*

La familia *Passifloraceae* representada por su principal género *Passiflora* se las identifica como aquellas plantas fanerógamas, dicotiledóneas, de hábitos de crecimiento trepador, entre sus representantes más conocidos se destacan la “curuba o tumbos”, “granada china”, “fruta de la pasión”, “parcha” entre otros. Leal (2003).

Es también conocida como la flor de la pasión que cuenta con 18 géneros y alrededor de 630 especies, se encuentran repartidas en regiones cálidas y tropicales en Sudamérica, distribuida en América tropical, hallándose en Colombia, Chile, Ecuador y Perú. Deginani (2001).

En nuestro país existen 3 géneros con 95 especies, de las cuales 29 son endémicas, se distribuye en la Costa, Amazonía y los Andes, se encuentran desde 0 hasta 4.500 m.s.n.m. Cerón (2015).

1.2. Distribución del género *Passiflora* en el Ecuador

El Ecuador es considerado como el país con mayor diversidad biológica, esto se debe a la posición geográfica, se encuentra atravesado por la cordillera de los Andes, existiendo varios pisos altitudinales y climáticos, factores que permiten la presencia de alrededor de 15901 especies de plantas. Sánchez (2016).

Por otro lado el Ecuador, posee contrastes paisajísticos modelados por la flora, la geología, el clima, corrientes marinas frías y cálidas; debido a esto los diversos botánicos que visitaron el país se maravillaron y trataron de buscar la forma de entender la diversa flora que existe en el Ecuador. Cerón (2015).

Debido a las diferentes características climatológicas que presenta el Ecuador el género *Passiflora* se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales, esto hace posible que se encuentren especies en las cuatro regiones del Ecuador.

1.3. Cultivo

El género *Passiflora* se caracteriza por ser resistentes a las heladas, la mayor parte de las especies toleran entornos secos, sobre todo sombra con suelos bien drenados, la multiplicación de éstas se da por semillas maduras o por división. Burnie y Cheers, (2006).

1.4. Descripción botánica del género *Passiflora*

Las especies del género *Passiflora* a criterio de diversos botánicos, al género se lo describe de la siguiente manera: son enredaderas leñosas, escandantes, venas o lianas perennes que trepan arboles por medio de zarcillos axilares, raramente lianas, arbustos o pequeños árboles Ocampo et al., (2007), además de presentar flores bisexuales, regulares con hipantio alargado y corona anular de filamentos erectos entre pétalos y los estambres frecuentemente 5 sostenidos con el pistilo formando el androginóforo. Cerón (2015).

1.4.1. Raíz

El género *Passiflora* es descrito de la siguiente manera: posee raíces con fibras uniformes, las raíces primarias son más gruesas y las secundarias son lignificadas. Bonilla, Aguirre, y Agudelo (2015).

1.4.2. Tallo

El tallo es el órgano encargado de proporcionar soporte a la planta y generar la reserva de agua; las formas que puede adoptar son: angulado o surcado, en otras se presentan de forma plana o alada, también pueden ser ligeramente estriados, estas características suelen acrecentarse al secarse. Ulmer y MaCDougal (2004). El tipo de tallo se encuentra estrechamente relacionado con el hábito de crecimiento de la planta, se denomina enredadera, liana escandente, arbusto y árbol. Bonilla et al., (2015).

Las enredaderas se caracterizan por tener un tallo delgado, poco leñoso, con zarcillos que utilizan para trepar y generar anillos concéntricos que aumentan cada año y con los cuales se pueden calcular su edad. Ulmer y MaCDougal (2004).

En el caso de liana escandente se refiere a que la mayoría de lianas trepan mediante armazones mecánicos que son fijados por zarcillos, operando como adhesivos. Romero (1999).

1.4.3. Zarcillos

En *Passiflora* los zarcillos son estructuras que brindan soporte a las plantas, su función es la de trepar los árboles, vegetación o muros con la finalidad de obtener luz solar; cuando el ápice del zarcillo se ha asegurado al soporte, se reduce su longitud al enrollarse en forma de hélice, y presenta un cambio de dirección sosteniendo el tallo cerca al soporte. Tillett (1988).

1.4.4. Hoja

En *Passiflora* la disposición de las hojas y del nudo son siempre de manera alterna; poseen una lámina foliar bien desarrollada de forma lobulada y una base generalmente cordada o a menudo puede ser truncada, redonda o cuneada, mientras que la venación es habitualmente palmada. Bonilla et al., (2015).

1.4.5. Flor

En *Passiflora*, la flor presentan formas variadas y colores, cuyas características son: su tamaño que puede variar desde 1 cm. hasta 20 cm. o en la longitud del tubo floral, en la parte más madura de la rama se encuentran los frutos, hacia el ápice se observan flores axilares solitarias o en pares. Bonilla et al.,(2015).

1.4.6. Fruto

Los frutos del género *Passiflora*, se caracterizan por ser bayas indehiscentes con pericarpio delgado, membranoso y carnosos; el fruto tiene forma de péndulo, los cuales se encuentran en la misma disposición que las flores. Tillett (1988).

1.4.7. Semilla

En *Passiflora* las semillas se encuentran en abundancia, siendo éstas aplanadas, con testa dura, forma variable entre ovaladas y obovadas, de coloración oscura pudiendo ser marrón o negra dependiendo del estado de madurez. Imig, (2013).

En el interior de la semilla se encuentra el endospermo que es de color blanquecino, son ricos en aceites y almidones los que aportarán con nutrientes al embrión en el proceso de germinación. Ulmer y MaCDougal (2004).

1.5. Plantas medicinales

Las plantas medicinales a través de la historia se las utilizó como productos terapéuticos en la medicina tradicional, una planta medicinal está compuesta por varias sustancias químicas, y se extrajeron sus componentes activos los que se emplearon en procesos fitoterapéuticos. Chávez (2017).

1.6. Propiedades terapéuticas del género *Passiflora*

En el género *Passiflora* sus hojas tienen múltiples usos, entre éstos: efectos depresores sobre el sistema nervioso central, actuando como sedantes, tranquilizantes, calmantes e insomnio, otro de los principales usos de este género son: tener efectos antiespasmódico, diaforético, hipotensor, diurético. Roman (2017).

1.7. Usos del género *Passiflora*

Las principales especies de este género tienen varios usos medicinales, entre las más destacadas, la *Passiflora edulis* “maracuyá” cuyas hojas en infusión presentan propiedades sedativas y antiespasmódicas, contrarresta el insomnio y palpitaciones nerviosas; se tiene de referencia que de las hojas secas de esta planta fueron usadas en rituales en forma de tabaco actuando como alucinógeno por antiguos Shamanes; la *P. manicata*, conocida también como “tauso cuco”, las agrupaciones en la zona de los andes, utilizaban los frutos como fuente de alimento además de las flores y hojas con las que se preparaban infusiones para regular la menstruación y como suplemento a su dieta después del parto. Quezada (1997).

La *P. foetida* conocida como “maracuyá silvestre” tiene el principio activo C-glicosilflavonas, las cuales se extraen de sus hojas, sirven para contrarrestar los cólicos estomacales. Leal (2003), la *P. mixta* llamada “curuba de monte” sus hojas se utilizan

para regular los ciclos menstruales y sus frutos son ingeridos por su alto contenido de vitamina C. Roman (2017).

Los frutos de varias especies son consumidos en repostería se destacan: *P. tripartita*, *P. ligularis*, *P. edulis*; su pulpa en el área industrial es utilizada, en contraste con las especies silvestres cuando se consume su pulpa existe el riesgo a la salud ya que las semillas de éstas presentan compuestos de cianuro, haciéndolas tóxicas. Freire (2004).

1.8. Plantas tóxicas

La coexistencia entre plantas y el ser humano es de gran importancia debido a la inmensa variedad de usos que han sido descubiertos, a través de varias investigaciones tales como: alimento, medicina, construcción, vestimenta, entre otros; cabe acotar que existen varios tipos de plantas que contienen sustancias nocivas a las cuales se las denomina como plantas tóxicas, estas pueden causar trastornos a los seres humanos siendo los principales efectos: irritaciones, comezón, quemaduras en la piel, vómitos, diarreas e incluso la muerte. Flores, Canto, y Flores (2001).

1.9. Reportes de intoxicación en el Ecuador causadas por el género *Passiflora*

Como lo menciona CIATOX (2015), las intoxicaciones causadas por la ingesta de plantas del género de estudio las cuales son consideradas tóxicas para el consumo humano en el Ecuador reportaron 12 casos en el año 2015 correspondiendo a las especies *Passiflora incarnata*, *P. ligularis* y *P. mixta*.

1.10. DNA barcoding

El método DNA Barcoding propuesto por el “Consortium for the Barcode of Life” (CBOL), es un organismo internacional especializado en asignar a cada especie un código de barras, por medio de una secuencia ya estandarizada y fidedigno de ADN la

cual permite su identificación, publicado por primera vez por el Dr. Paul Hebert (2003), en la actualidad se ha convertido en un instrumento fundamental en el estudio de la Botánica, esta aplicación es particularmente útil a la hora de analizar poblaciones debido a que una muestra permite describir a la especie a la que pertenece, clasificando así molecularmente a toda la biodiversidad. Cires, (2010).

Para las plantas, el grupo botánico del (CBOL) y otros expertos indican el uso de ciertos genes cloroplásticos tales como *rbcL*, *matK*, a utilizarse como código de barras, estos también se sugiere complementarlos con regiones adicionales como genes nucleares multicopia *ITS* si fueran necesarios. Cadavid (2013).

1.11. Técnicas moleculares

Para Murray, Rosenthal y Pfaller (2017), la secuenciación de ácidos nucleicos y las técnicas proteómicas se las utiliza como referencia en el proceso de identificación de plantas, por lo que la secuenciación es la forma más eficaz y objetiva para identificar especies fundamentándose en la amplificación de las regiones.

Los análisis moleculares se inicia con el proceso de la extracción de ADN, a continuación se procede con la amplificación de un segmento a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y finalmente la secuenciación. Morerira, Huising y Bignell (2012).

1.12. Identificación molecular

Como lo menciona Azofeifa (2006), la identificación molecular es el conjunto de técnicas empleadas en el reconocimiento de especies por medio de marcadores moleculares, siendo aplicables a cualquier tipo de material vegetal y que pueden ser evaluados en cualquier estado que se encuentre la planta.

1.13. Extracción de ADN en plantas

La extracción de ADN, consiste en pulverizar el tejido vegetal para luego fragmentar sus paredes celulares para la liberación de ADN; para ello se puede emplear varios métodos tales como: bajas temperaturas siendo la sustancia principal el nitrógeno líquido o también el método físico de maceración o molienda que son utilizadas para atravesar las membranas celulares; una vez producida la ruptura, el tejido es disgregado a células se procede con la extracción química mediante reactivos tales como: solución buffer (que es un detergente que nos ayudará en la separación del ADN de otros elementos celulares), dando como resultado una muestra limpia de ADN, posteriormente se debe eliminar los desechos, este proceso se añade una proteasa que ayuda a degradar las proteínas asociadas al ADN. Salavarieta (2002).

Para lograr la inhibición de enzimas que destruyen al ADN, estas deben ser inactivadas con la finalidad de garantizar la calidad de la misma, se ejecuta el método físico, que consiste en la desnaturalización por calor, es decir, llegar a la temperatura de 65 °C por un lapso de 10 min inmediatamente se añaden los solventes orgánicos el fenol y el cloroformo, los que remueven las proteínas, formando dos fases; en la parte superior se obtiene el ADN precipitado libre de enzimas y la parte inferior se encuentran las proteínas, por último se realizan lavados utilizando etanol para obtener un ADN purificado, una vez purificado éste se añade un tampón ligeramente alcalino (TE) ayudando a disolver el ADN. Rogers y Bendich (1988).

1.14. Electroforesis

La electroforesis estudia la migración de los iones y las partículas coloidales cuando se encuentran bajo la acción de un campo eléctrico, siendo la principal técnica de separación y análisis de macromoléculas de acuerdo a su carga eléctrica y otras características como el peso molecular, tamaño, estructura. Gónzales (2008), cualquier

partícula cargada de iones al ser colocada en un campo eléctrico migrarán por el efecto de la atracción de cargas opuestas a través de un solvente conocido como TBE.

Para visualizar las macromoléculas se debe utilizar un colorante químico denominado fluoróforo el cual se intercala entre las hebras de la doble cadena de ADN, en la actualidad se emplea *Sybr Safe* ($C_{28}H_{28}N_2O_3S_2$), el cual absorbe la luz azul a una longitud de onda máxima de 509 nm y emite luz verde a una longitud de onda de 524 nm Garibyan y Avashia (2013).

1.15. Reacción en cadena de la Polimerasa PCR

PCR convencional, es un ensayo enzimático que permite la amplificación exponencial de una molécula de ADN, generando millones de copias de un fragmento, este proceso se lleva a cabo por medio de la presencia de ADN molde, cebadores, nucleótidos y ADN polimerasa; es utilizado con el fin de amplificar cualquier ADN, el único requisito es conocer la secuencia de los nucleótidos que rodean dicha región que contienen síntesis de ADN en el punto deseado. Tamarin, (2015)

El ADN polimerasa se emplea para replicar varias veces una región determinada de ADN, la reacción empieza calentando el ADN diana a 95 °C, lo cual separa las hebras, luego es necesario descender la temperatura para que los cebadores se emparejen con sus secuencias complementarias sobre cada hebra, en un ciclo de amplificación se obtiene dos moléculas de ADN nuevas a partir de la original; el proceso se repite múltiples veces teniendo un crecimiento exponencial en cada ciclo de amplificación. Los múltiples ciclos de calentamiento y enfriamiento se llevan a cabo por medio de sistemas térmicos programables mediante un equipo denominado termociclador. Cooper y Hausman (2009).

Esta técnica tiene facilidad por el uso de DNA polimerasas de una bacteria de aguas termales llamada *Thermus aquaticus* que puede resistir a la temperatura de desnaturalización. Tamarin, (2015)

1.16. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares de ADN se utiliza para examinar el genoma y la obtención de mapas genéticos, ayudados por la técnica de la PCR, juntos logran el identificar regiones de ADN de interés, existen diversos marcadores tales como *ITS*, *matk*, *Rpoc*, *Rpob*, *Rbcl* (Bello, 2001)

1.16.1. *matK*

El segmento *matK* es una maturasa implicada en el proceso de splicing, cuyo tamaño es aproximadamente 1570 pb en longitud, la maturasa es el factor de maduración del pre RNAm; este segmento se encuentra localizado dentro de un intrón del gen cloroplastídico *trnK* (RNAt-lys). Wojciechowski, Lavin, y Sanderson, (2004).

Este segmento fue propuesto para Barcode por Lahaye *et al.* (2008), se caracteriza por tener una tasa evolutiva rápida y provee una alta señal de filogenia la cual resuelve relaciones evolutivas entre plantas de todos los niveles taxonómicos.

1.16.2. *rbcl*

El gen *rbcl* es la proteína principal en la fijación de dióxido de carbono en la fotosíntesis la cual codifica para la subunidad grande de la ribulosa ribulosa-1,5-bisfosfato (RUBISCO). Contreras *et al.*, (2007), tiene una alta universalidad, con fácil amplificación en genomas de plantas y presenta buena calidad de las

secuencias, por otro lado este segmento tiene bajo poder de discriminación de especies, debido a su baja tasa evolutiva, siendo utilizada más en la identificación a nivel de familia o género. Hollingsworth *et al.*, (2009).

1.17. Secuenciación

El término secuenciación del DNA hace referencia a las técnicas utilizadas que permiten determinar el orden de los nucleótidos: Adenina, Timina, Citosina y Guanina, para descifrar genes y genomas; existen diversos métodos siendo las principales: Roche-454 (pirosecuenciación), Ion Torrent (secuenciación por semiconductores), Illumina/Solexa (secuenciación con terminadores reversibles), SOLiD (secuenciación por ligamiento) y la más utilizada el método Sanger (didesoxinucleótidos). Suarez (2015).

1.17.1. Técnica de Sanger

La técnica de Sanger o llamado también didesoxi se establece por una disposición de cebador en el DNA que va a ser secuenciado y replicado, la síntesis de ADN se ubican en posiciones conocidas mediante nucleótidos terminadores de la cadena; la terminación de cadena se consigue utilizando nucleótidos cuyos azúcares carecen de grupos OH en los dos carbonos 2' y 3', de ahí el término didesoxi; debido a la detención de la síntesis de base conocida, la muestra se somete en cuatro mezclas de reacción distintas, cada una de las cuales contiene los cuatro nucleótidos normales, una vez construida la configuración del cebador se toma cuatro submuestras, cada una incluye los cuatro nucleosidos trifosfato y DNA polimerasa, un nucleosido trifosfato está cargado radioactivamente con P32, esta marca permitirá identificar el DNA sintetizando

de nuevo por una autoradiografía con la cual se asegurará la secuencia de interés con los nucleótidos en las posiciones adecuadas. Tamarin, (2015)

1.17.2. Análisis bioinformáticos

La Bioinformática es el conjunto de varias ramas tales como: Informática Estadística, Química y Ciencias Biológicas; esta se divide en dos subcampos que son: a) el desarrollo de herramientas informáticas y bases de datos, por medio de herramientas que favorecen en el análisis estructural y funcional, b) la construcción de árboles por medio de datos biológicos. Escobar, Murillo, y Soto (2011).

1.18. Análisis de secuencias

El software FinchTV permite ver y editar fácilmente secuencias de ADN por medio de cromatogramas, el cual nos mostrará los valores de calidad por medio de picos, permitiendo editar, es decir eliminando ciertas condiciones que no son útiles cuando se proceda a validar la secuencia FinchTV (2006).

1.18.1. Revisión de bibliotecas moleculares

Con el propósito de comparar las secuencias que se obtuvieron durante el proceso de secuenciación, se realiza un análisis y validación de la misma por medio de esta página web, llamada National Center for Biotechnology Information (NCBI), siendo éste un grupo de registros compuesto por múltiples bases de datos interconectados la cual permitirá acceder a secuencias, proteínas, genomas, taxonomía, publicaciones, entre otros, para corroborar los datos NCBI (2018).

1.18.2. Blast (Basical Logical Alignment Search Tool)

Por otro lado NCBI ofrece la herramienta BLAST, la que se encarga de comparar una secuencia determinada con las secuencias consenso que se encuentran subidas en las bases de datos de manera automática, cuya función es de relacionar una secuencia desconocida con un determinado grupo taxonómico ya establecido NCBI (2017).

1.18.3. Identificación en bibliotecas moleculares

Se denominan como la base de la investigación científica, que contienen grandes volúmenes de información que por medio de herramientas computacionales avanzadas proporciona un almacenamiento y procesamiento de datos. Escobar *et al.*, (2011).

1.18.4. Boldsystem

Es una plataforma web que se encarga de almacenar y analizar datos basados en la nube que ha sido desarrollada en el Centro de Biodiversidad Genómica en Canadá, consta de varias herramientas entre las más destacadas son: un portal de datos, un portal educativo, un registro de BIN (especies putativas) y un banco de trabajo de recopilación y análisis de datos. Boldsystem (2018a).

1.18.5. Herramienta de identificación en boldsystem

El sistema de identificación que se lo realiza a nivel de plantas utiliza secuencias consenso de genes *rbcL* y *matK*, recomendados por el (CBOL), es la herramienta de identificación por medio de códigos de barras, una vez copiada la secuencia se procede a la identificación de la misma. Boldsystem (2018b).

1.19. Filogenia

La filogenia se caracteriza por establecer las relaciones evolutivas entre grupos de organismos y su evolución a partir de un ancestro común, además se encarga del estudio de los vínculos evolutivos mediante la incorporación de información genealógica de evolución de las especies; por lo tanto, el análisis filogenético de secuencias de genes es uno de los métodos moleculares para comprender los patrones evolutivos cuyo proceso se encarga de realizar inferencias biológicas a partir, ADN, ARN y de las estructuras primarias de las proteínas Benitez (2004).

1.19.1. Construcción de árboles filogenéticos

El software MEGA 6 es una herramienta integrada que permite realizar la alineación de secuencias, inferir árboles filogenéticos, estimar tiempos de divergencia, extraer bases de datos en línea, estimar las tasas de evolución molecular, inferir secuencias ancestrales y probar hipótesis evolutivas. Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, y Kumar (2013).

1.19.2. Árboles filogenéticos

La herramienta principal para la reconstrucción filogenética es la formación de árboles filogenéticos, consiste en diagramas que muestran el patrón y el tiempo de divergencia en la historia evolutiva de un taxón, estos árboles están constituidos por nodos los cuales soportan las ramas conectando los individuos del taxón mientras que el ancestro común está representado por la raíz de todos los nodos presentes en el árbol. Chi (2013).

Para construir los árboles filogenéticos es importante recalcar que existen varios enfoques diferentes para inferir relaciones evolutivas, el primer enfoque se basa en distancias, las relaciones evolutivas se infieren sobre la base de grado global de similitud entre los organismos, evaluando una serie de características fenotípicas o secuencias de genes diferentes agrupando los organismos sobre la base de su similitud; el segundo enfoque es llamada como máxima parsimonia, se basa en relaciones filogenéticas sobre la base del número mínimo de cambios evolutivos que debe haber tenido lugar desde que los organismos tuvieron por última vez un ancestro común. Pierce (2016).

Una vez elegido el enfoque, se construye el árbol basándose en programas computarizados que comparan características fenotípicas o datos que vienen en las secuencias para agrupar a los organismos

Capítulo II

Metodología

2.1 Manejo de ejemplares en el Herbario Nacional del Ecuador QCNE

Antes de realizar la salida al campo, se hizo una visita al Herbario Nacional del Ecuador QCNE ubicado en la ciudad de Quito, con el objetivo de ubicar las especies del género *Passiflora* colectadas en el Ecuador, conocer su morfología y puntos de colección para determinar su distribución.

2.2 Colección de plantas al azar

Una vez obtenido los datos previamente descritos en el herbario QCNE, se realizó la salida de campo a los puntos marcados con el fin de obtener muestras de cada especie, los datos de colección se registraron en el libro de campo de Marco Cerna a partir del código 3366; a cada muestra se le asignó un número de colección, se registró la siguiente información: número de colección, fecha, datos geopolíticos, Nombre científico, nombre común, ubicación geográfica latitud, longitud y elevación, descripción del hábitat, descripción botánica y nombre de los colectores. Las plantas se colectaron utilizando una podadora de mano, para lo cual se cortó una rama de 30 cm aproximadamente que contenía varias hojas sanas, flores o frutos. Las muestras para obtención de ADN fueron hojas jóvenes, sanas y libres manchas y cicatrices, las muestras colectadas se depositan en fundas de papel *kraft*, con el respectivo número de colección, de acuerdo con la técnica descrita por el Instituto Nacional de Biodiversidad, (2008).

2.3 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN total se obtuvo a partir de muestras frescas, hojas jóvenes de las diferentes especies de *Passifloras*, colectadas en la zona Norte del Ecuador.

Para la extracción de ADN total como lo menciona Rivas y Salazar (2017), se realizó el protocolo de extracción simple de ADN foliar de Doyle y Doyle (1987), se colocaron 40 g de tejido foliar fresco en tubos eppendorf de 2 mL, previamente etiquetados con los números de referencia que se obtuvieron durante la recolección; a estas muestras se las pulverizó con la ayuda del nitrógeno líquido. A continuación se agregó 600 µL de Buffer de Lisis (100 mM TrisCl (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8) y 500 mM NaCl) y se agitó con la ayuda de un vórtex para homogenizar la muestra, seguidamente se añadió 94 µL de SDS (Dodecilsulfato sódico) al 10 % y se mezcló por inversión 6 veces, posteriormente se procede a colocar los tubos eppendorf en un baño María durante 10 min a 65 °C, inmediatamente se agregó 118.5 µL de acetato de potasio (K-acetato 5 M), se mezcló por inversión 6 veces, una vez homogenizada la muestra se colocó los tubos en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 5 min, en seguida se procede a transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 2 mL previamente etiquetados con los números de referencia, luego se adicionó 600 µL de fenol: cloroformo en proporción (1:1), se centrifugó a 13000 rpm por 5 min, después de este proceso se formaron dos fases, la fase superior se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL y finalmente se agregó 360 µL de isopropanol frío, se las mezcló suavemente por inversión 6 veces y se almacenó a -20° C por toda la noche.

Al siguiente día se procedió a centrifugar por 3 minutos a 13000 rpm, después de lo cual se formó un pelet, se eliminó el sobrenadante y luego se lavó con etanol frío al 70 %, se añadió 400 µL de etanol frío, se centrifugó por 3 min a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante, se realizó este proceso por tres veces. Para eliminar el

solvente mezclado con el pelet se ubicó las muestras en un termo bloque a 37 °C durante 30 min. Finalmente, se re suspendió el pelet en 30 µL de TE 1X (10 mM TrisCl (pH 8) y 1 mM EDTA) que permite conservar el ADN obtenido.

2.4 Visualización del ADN extraído por medio de electroforesis horizontal

Para determinar la presencia de ADN, mediante la técnica de Electroforesis horizontal se preparó el gel de agarosa al 1 % (50 mL solución TBE 1x y 0.5 g de agarosa ultra pura de Invitrogen, calentada en microondas durante 1 min); cuando la temperatura de la agarosa alcanzó 38 °C, se colocó 5 µL de *Sybr Safe* de Invitrogen; antes de que se solidifique el gel es necesario ponerlo en el molde rectangular con el peine con el fin de marcarse los posillos donde se colocaran las muestras. Inmediatamente se procedió a agregar la solución TBE 1x hasta que cubra totalmente el gel, cuando la cámara estuvo lista se procedió a cargar las muestras, es decir se tomó 4 µL de ADN cloroplástico y 4 µL de tampón de carga “BLU” compuesto por Xileno Cianol (25 mg) y Sucrosa (4 g), en el caso de producto PCR se tomó 4 µL de producto PCR y 4 µL de tampón de carga “BLU”, antes de programar la cámara se preparó la muestra de la siguiente manera: se toman 3.5 µL de Ladder y 4 µL de tampón de carga “BLU” con la finalidad de observar las pares de bases, una vez cargadas las muestras, se procedió a setear la cámara de electroforesis horizontal Labnet a las siguientes condiciones a 90 Voltios por 40 min, visualizándose el resultado en el fotodocumentador Bio-imaging systems. Lee, Costumbrado, Hsu, y Kim (2012).

Se comparó de manera cualitativa el tamaño y la concentración de las bandas obtenidas con el inserto del DNA Ladder O’Gener ruler y TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, 2017b) como se muestra en la figura 1

Escalera Molecular

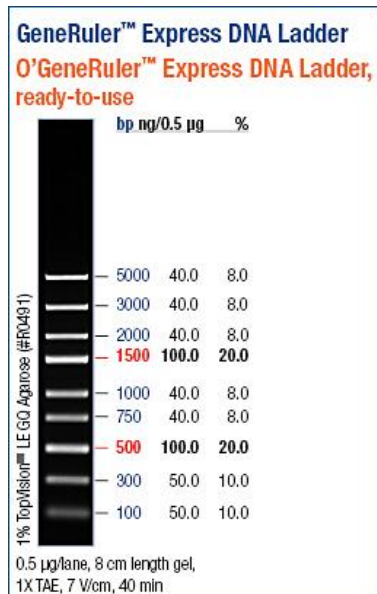


Figura 1. Escalera molecular O'Gener ruler
 Fuente: (Thermo Fisher Scientific, 2017)

Escalera molecular

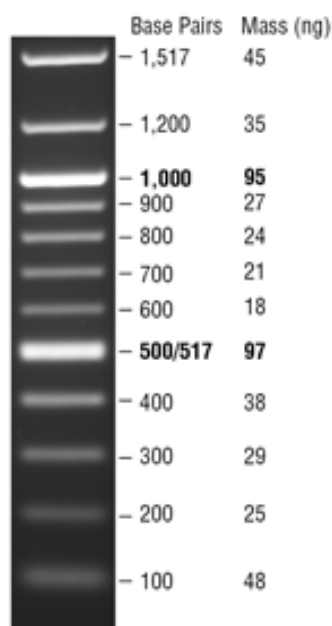


Figura 2 Escalera molecular TrackIt™ 100 bp
 DNA Ladder
 Fuente: (Thermo Fisher Scientific, 2017)

2.5 Amplificación

Una vez extraído el ADN, se amplificó un segmento del gen Maturasa K *matK* presentando un tamaño de 730 pb; para lo cual se combinaron los siguientes elementos para un volumen total de 25 μ L:

12.5 μ L 2 x Phire Plant Direct PCR Master Mix, 1.25 μ L Disolution Buffer, 0.5 μ L primer forward *matK_1 RKIM* (ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC), 0.5 μ L primer reverse *matK* (CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAGAG), 1 μ l de ADN, 9.25 μ L de agua libre de nucleasas; este protocolo se desarrolló usando un bloque frio *LightCycler® Centrifuge Adapters* - Roche en la cámara de flujo laminar *Espectrocom* con materiales previamente esterilizados.

Una vez preparada la master mix se usó el termociclador *Labnet Multigene* con el siguiente programa: inicio de la desnaturalización 95 °C por un período de 5 min, a continuación 35 ciclos de: 95 °C por 40 seg, 52.8 °C para el temperatura de fusión por 30 seg, 72 °C por 1 min para la extensión inicial; al terminar los ciclos se produce la extensión final a 72 °C por 8 min, finalmente la etapa de mantenimiento a 4 °C Cauz et al., (2017).

2.6 Secuenciación

La secuenciación de los productos PCR en esta investigación, se realizó por medio de la empresa MACROGEN ubicada en Corea del Sur, ellos utilizan el método de SANGER, en la cual se identifica a los nucleótidos que forman parte de los segmentos amplificados. Las muestras fueron enviadas en un volumen de 20 μ L cuya concentración de masa fue de 95 ng/ μ L.

2.7 Análisis y validación de secuencias

Los cromatogramas enviados por MACROGEN fueron analizados por medio del software FinchTV (2006), el cual permite visualizar el porcentaje de confiabilidad de cada nucleótido, este caso se trabajó con un 80 % de confiabilidad, se eliminó el ruido de los extremos.

Las secuencias del segmento *matK* fueron analizadas con el software **BLAST** su función es comparar una secuencia query con una gran variedad de secuencias que se encuentren almacenadas en la base de datos **Gen bank**, el algoritmo agrupará con secuencias que tengan la mayor similitud, obteniéndose la identidad del espécimen analizado.

2.8 Consulta de base de datos en Boldsystems

Para completar la información filogenética del género se descargó secuencias del segmento *matK* de especies del género *Passiflora* que no están presentes en la zona de colección, estas fueron *P. riparia*, *P. capsularis*, *P. sexflora*, *P. adenopoda*, *P. biflora*, *P. micropetala*, las cuales se encuentran presentes en el Ecuador; adicionalmente se obtuvieron secuencias del segmento *rbcL* se complementaron con las especies colectadas y amplificadas con el segmento *matK* y las siguientes especies: *P. auriculata*, *P. foetida*, *P. micropetala*, *P. punctata*, *P. trifasciata*, *P. vespertilio*.

2.9 Construcción del árbol filogenético

Para comenzar a construir el árbol filogenético se realizó una búsqueda exhaustiva en la biblioteca virtual **BOLDSYSTEM**, para obtener secuencias con el gen *rbcL* se utilizó este segmento debido a que en la base de datos se encontró la mayoría de especies colectadas, estas formaron parte del árbol filogenético de este segmento y del árbol concatenado con la finalidad de visualizar las relaciones evolutivas que presenta

el género *Passiflora*, se utilizó el software MEGA 6 Tamura et al., (2013), el primer paso fue alinear todas las secuencias obtenidas mediante el algoritmo Muscle, que identificó secuencias homólogas y permitió establecer el grado de similitud entre muestras analizadas Robert, (2004).

Se elaboraron tres árboles filogenéticos, el primero usando un segmento del gen *matK*, el segundo árbol filogenético usando un segmento de gen *rbcL* y el tercero concatenado los dos segmentos *matK* y *rbcL*; usando el algoritmo NeighborJoiningTree, y el modelo de estimación de distancias de secuencias Jukes-Cantor y bootstrap de 1000 réplicas.

Capítulo III

Resultados y Discusión

3.1 Colección de especies

En este trabajo se colectaron 12 especies del género *Passiflora*, en la región norte del Ecuador, en cinco provincias Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Santo Domingo de los Tsáchilas y Napo los datos de colección se registraron en el libro de campo de Marco Cerna como se observa en la tabla 1.

Tabla 1

Listado de las especies colectadas del género *Passiflora* para este estudio

| Número de colección | Provincia | Espécimen | Altura (m.s.n.m) | Coordenadas |
|---------------------|--------------------------------|---|------------------|-------------------------------|
| 3432 | Santo domingo de los Tsáchilas | <i>Passiflora edulis</i> Sims | 739 | 00°35'S 079°22'W |
| 3366 | Tungurahua | <i>Passiflora ligularis</i> Juss | 1800 | 01°24'S 078°22'W |
| 3452 | Pichincha | <i>Passiflora mixta</i> L.f. | 3556 | 00°03'N 078°26'W |
| 3451 | Pichincha | <i>Passiflora tripartita</i> (Juss.) Poir. | 2900 | 00°09'S 078°26'W |
| 3397 | Santo domingo de los Tsáchilas | <i>Passiflora quadrangularis</i> L. | 820 | 00°33'S 079°15'W |
| 3556 | Santo domingo de los Tsáchilas | <i>Passiflora maliformis</i> L. | 500 | 0°0'13,9' 'S 79°22'43,5 'W |
| 3434 | Cotopaxi | <i>Passiflora caerulea</i> L. | 3178 | 0°45'6"S 0°45'13"W |
| 3437 | Napo | <i>Passiflora ambigua</i> Hemsl. | 510 | 01°04'S 077°36'W |
| 3804 | Napo | <i>Passiflora alata</i> Curtis. | 420 | 0°41'11.6"S 78°00'40.0"W |
| 3805 | Napo | <i>Passiflora macrophylla</i> Spruce ex Mast. | 750 | 1°04'53.9"S 77°53'11.6"W |
| 3806 | Napo | <i>Passiflora tryphostemmatoides</i> Harms | 850 | 1°13'11.7"S 78°05'35.9"W |
| 3807 | Pichincha | <i>Passiflora morifolia</i> Mast. | 3117 | 0°04'04.9"N 77°51'04.8"W |

Nota: Especímenes colectados del género *Passiflora* en la región norte del Ecuador

Fuente: (El autor, 2018)

3.1.1 Identificación, descripción morfológica, fitoquímica y usos

Los especímenes recolectados fueron identificados morfológicamente, descritos, se describe su uso y se presenta los principales componentes químicos.

Especies colectadas

a) *Passiflora edulis* Sims

Nombres comunes: En el Ecuador se los conoce como “maracuyá”, “parchita, pasionaria”, “chinola”

Descripción: Se caracteriza por ser una enredadera, cuyas flores presentan una tonalidad verde poseen un tamaño aproximado de 5 cm de diámetro, sus sépalos y pétalos de color blanco; sus hojas son trilobadas, su fruto es amarillento cuando está maduro y las semillas son de color negro.

Fitoquímica y usos: Según Peñaherrera et al., (2016). esta planta contiene un flavonoide denominado glicosilados heC-glucosylflavones, al cual se le atribuye el efecto antiinflamatorio, adicionalmente en la industria alimenticia utilizan la fruta para elaborar jaleas, gelatina, jugos, mientras que en la ganadería se utiliza la cáscara para preparar raciones para animales ya que estas presentan una alta cantidad de aminoácidos, proteínas, carbohidratos y pectinas. Tapia, (2013).

Foto de *Passiflora edulis* Sims (Maracuyá)

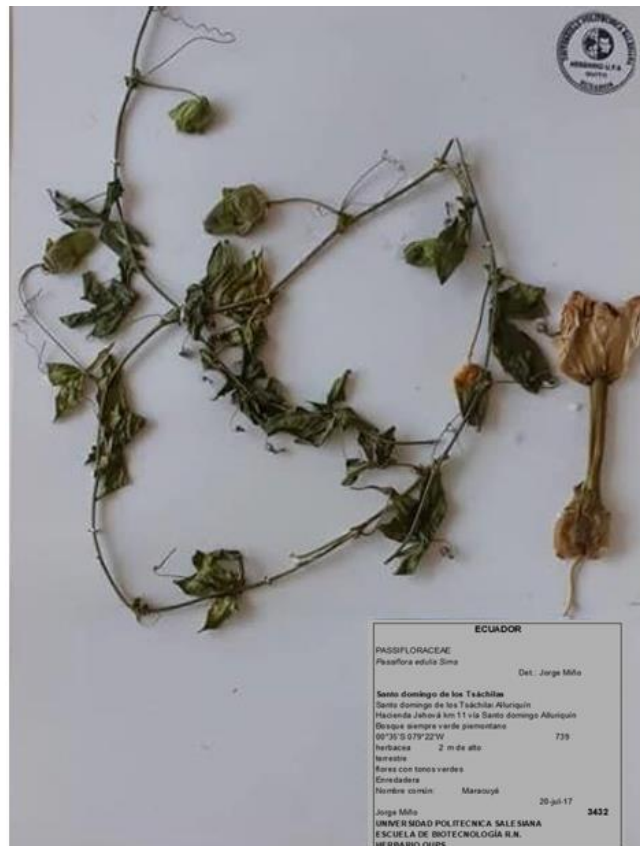


Figura 3. Voucher de *Passiflora edulis* Sims
Fuente: (El autor, 2018)

b) *Passiflora ligularis* Juss

Nombres comunes: En el Ecuador se los conoce como “granadilla”, “granadilla común”, “granadilla de China”

Descripción: Es una enredadera glabra cuyos tallos tienen la forma cilíndrica, las flores son de color violeta, y miden entre 8-14 cm; las hojas son enteras basifijas; el fruto es una cápsula ovoide de forma casi esférica de color amarillo y las semillas son de color negro.

Fitoquímica y usos: según Pinduisaca, (2016). menciona que esta planta contienen alcaloides indólicos tales como el harmano y harmina, en la industria farmacéutica esta es utilizada para la ansiedad, el insomnio, migraña, vértigo, sin embargo shamanes utilizan el jugo como estimulante digestivo esto se debe a la gran cantidad de fibra presentes en las semillas actuando como estimulante digestivo para combatir los parásitos Loza (2013).

Foto de *Passiflora ligularis* (Granadilla)

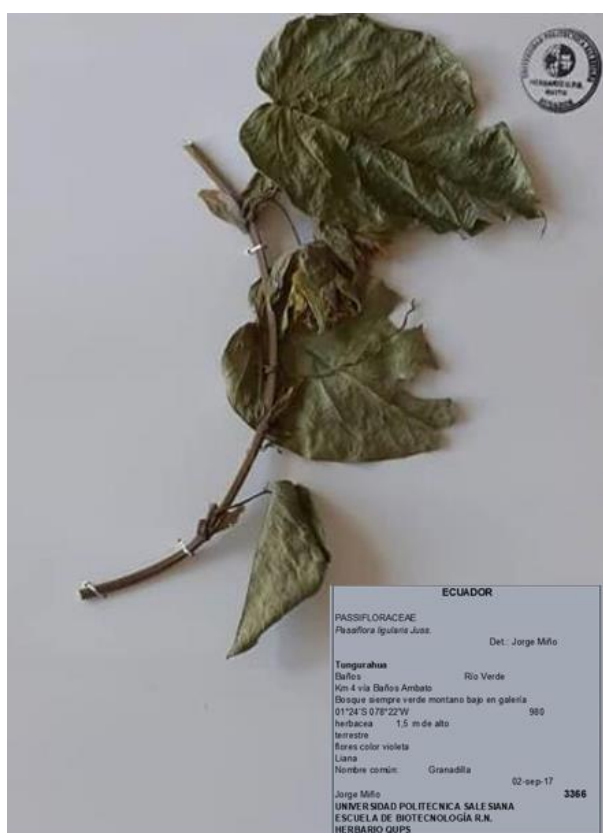


Figura 4. Voucher de *Passiflora ligularis* Juss
Fuente: (El autor, 2018)

c) *Passiflora mixta* L.f.

Nombres comunes: En el Ecuador se los conoce como “curuba de monte” y “monte de tumbo”, mientras que en Perú la denominan “parcha”

Descripción: Son plantas trepadoras, presenta tallos angulosos, las flores son de tono rojizo cuyo tamaño va de 7 a 15 cm, sus hojas son trilobadas y sobresalen de las ramas, el fruto presenta la forma de óvalo de color verde y las semillas son de color negro.

Fitoquímica y usos: Según Peñaherrera et al., (2016), esta planta contiene el antioxidante resveratrol en la industria farmacéutica se utiliza para aliviar inflamaciones intestinales y de las vías urinarias, por otro lado en la industria alimenticia esta fruta se utiliza para elaborar barras energéticas debido a la gran cantidad de oligoelementos y azúcares

Foto de *Passiflora mixta* L.f. (Curuba de monte)



Figura 5. Voucher de *Passiflora mixta* L.f.
Fuente: (El autor, 2018)

d) *Passiflora tripartita* (Juss.) Poir.

Nombres comunes: En el Ecuador se los conoce como “taxo”, “tumbo, curuba”, mientras que en Colombia la denominan “curuba de castilla”

Descripción: Es una enredadera cuyo tallo es redondo, la flor presenta un tono rosado cuyo tamaño es de 4 a 8 cm, sus hojas son trilobadas color verde oscuro, el fruto es de forma oblonga de color amarillo y las semillas son de color negro.

Fitoquímica y usos: Según Charco (2017). menciona que esta planta contiene al flavonoide crisina, es utilizado para aumentar la testosterona, en la industria alimenticia esta fruta es utilizada para elaborar jugos, compotas, helados por su alta cantidad de vitamina A y C Leal, (2003).

Foto de *Passiflora tripartita* (Juss) Poir. (Taxo)



Figura 6. Voucher de *Passiflora tripartita* (Juss) Poir.
Fuente: (El autor, 2018)

e) *Passiflora quadrangularis* L.

Nombres comunes: En el Ecuador se los conoce como “badea”, “sandia de la pasión” mientras que en Colombia la denominan “tumbo gigante”, “quijon”

Descripción:

Se caracteriza por tener el tallo cuadrangular, contiene zarcillos hasta de 30 cm, su flor es de color morado, las hojas son trilobadas, membranosas, los frutos son verde oscuro ovalado y las semillas son de color negro.

Fitoquímica y usos: Según Leon, (2000). menciona que esta planta contiene al terpeno glycosido quadrangulosido, en la industria farmacéutica se utiliza como remedio para la hipertensión, por consiguiente el uso alimenticio más común es la preparación de bebidas envasadas, conservas y la fruta fresca por parte de agricultores Velásquez (2016).

Foto de *Passiflora quadrangularis* L.(Badea)



Figura 7. Voucher de *Passiflora quadrangularis* L.

Fuente: (El autor, 2018)

una

f) *Passiflora maliformis* L.

Nombres

comunes: En el Ecuador se los conoce como “calabacito de indio”, “cholupa”

Descripción: Es liana de tallo delgado glabro,

cuyas flores son de color rosado, las hojas son trilobadas, el fruto es de forma redonda de color amarillo anaranjado y las semillas son de color negro.

Fitoquímica y usos: Según Maldonado et al., (2015), esta planta contiene quercetina, es un flavonoide que tiene efectos antihipertensivos, adicionalmente esta especie se utiliza como control biológico presenta resistencia a hongos se utiliza como portainjeto de especies de granadilla, maracuyá, taxo. Bohórquez, Araque, y Pacheco (2012).

Foto de *Passiflora maliformis* L. (Cholupa)

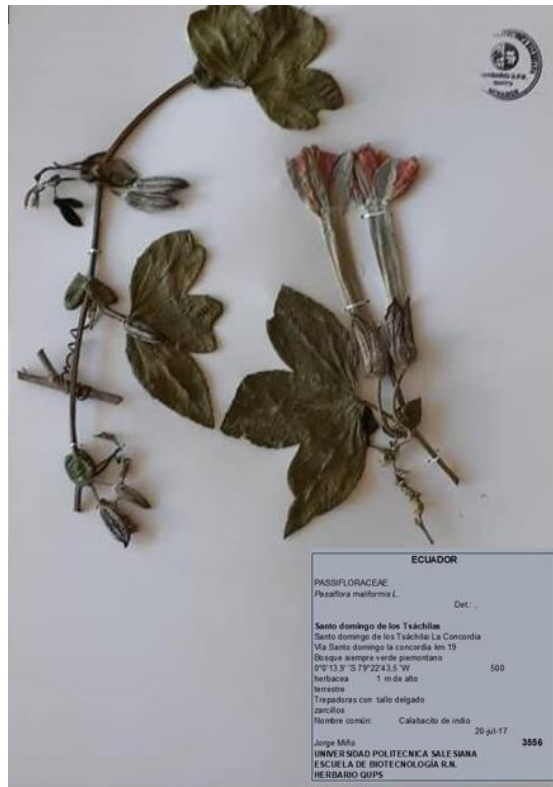


Figura 8. Voucher de *Passiflora maliformis* L.
Fuente: (El autor, 2018)

g) *Passiflora caerulea* L.

Nombres comunes:

En el Ecuador se

los conoce como “granadilla de monte”, “pasionaria”

Descripción: Es una liana de tallo glabro y verdoso, las flores son de color blanco-verdoso, posee hojas simples, el fruto suele ser una baya y las semillas son de color negro.

Fitoquímica y usos: según Pinduisaca (2016). menciona que esta planta contiene orientina, es una flavona que tiene efectos antiespasmódicos, por otro lado los usos tradicionales de esta planta se usan de diferentes maneras; la infusión de sus hojas y flores ayudan a combatir estados de ansiedad, tensión nerviosa e insomnio, el fruto tiene acción diurética, la infusión de la raíz regula el ciclo menstrual Severin, Bueno, Dantín, y Giubileo (2011).

Foto de *Passiflora caerulea* L. (Pasionaria)

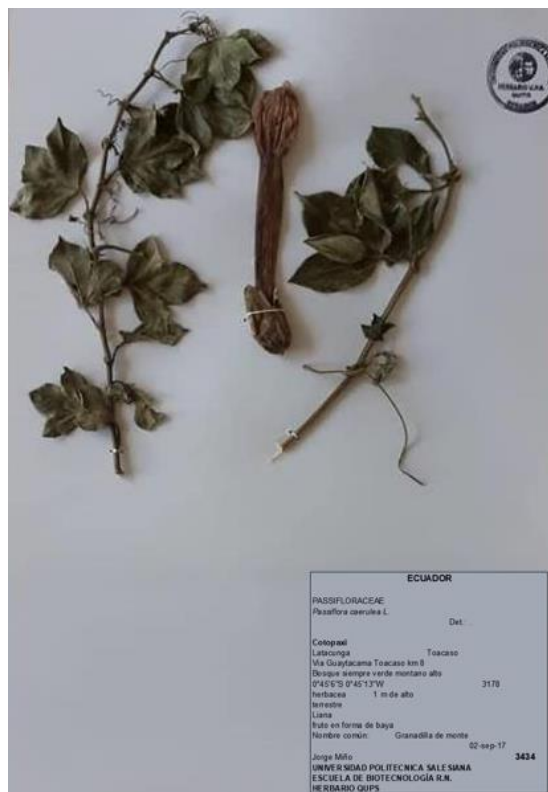


Figura 9. Voucher de *Passiflora caerulea* L.
Fuente: (El autor, 2018)

h) *Passiflora morifolia* Mast.

Nombres comunes: En el Ecuador se los conoce como “granadilla de bosque”, “pasionaria azul”, “maracuja azul”

Descripción: Trepadora de tallo delgado, las flores son de color blanco miden entre 6-9 cm; las hojas son enteras basifijas el fruto es una cápsula ovoide de forma casi esférica de color azul y las semillas son de color anaranjado.

Fitoquímica y usos: Según Maldonado et al, (2015), esta planta contiene ácido ascórbico, es un antioxidante que contribuye a reducir el daño celular causado por el estrés oxidativo.

Foto de *Passiflora morifolia* Mast. (Pasionaria azul)



Figura 10. Voucher de *Passiflora morifolia* Mast.
Fuente: (El autor, 2018)

i) *Passiflora ambigua* Hemsl.

Nombre común: En el Ecuador se los conoce como “Granadilla de piedra”, “pasión” mientras que en Brasil la denominan “granadilla gigante”

Descripción: Es una liana cuyo tallo es cuadrangular, su flor es de color rosado, las hojas son trilobadas, los frutos son verde morado y las semillas son de color negro.

Fitoquímica y usos: Según García, (2017), esta planta contiene vitamina E es un antioxidante importante para contrarrestar la diabetes.

Foto *Passiflora ambigua* Hemsl. (Granadilla de piedra)

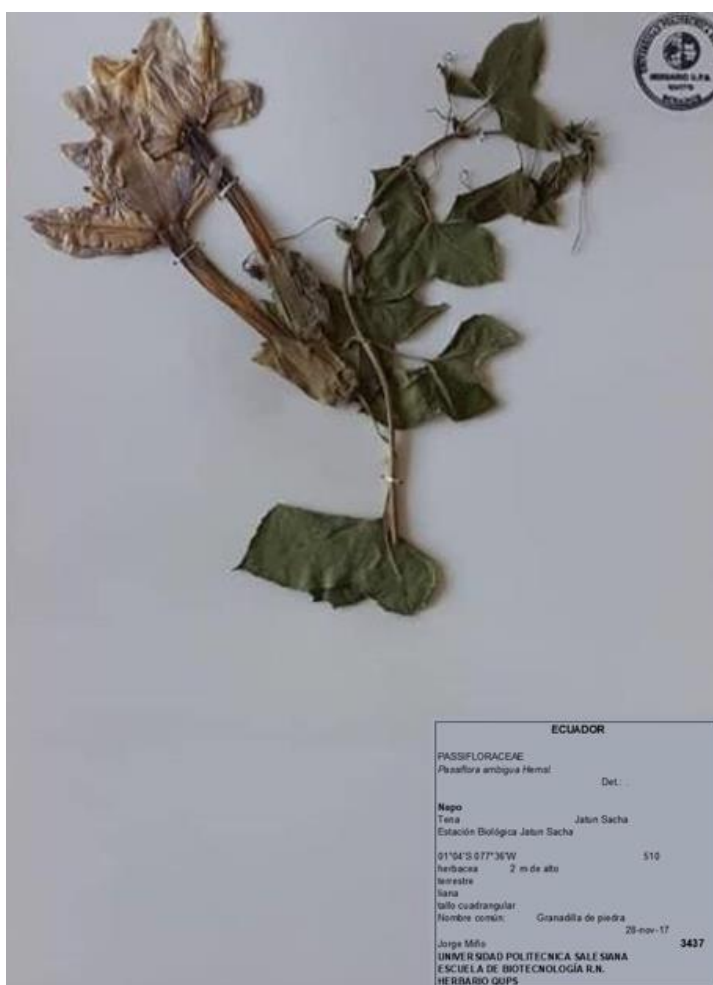


Figura 11. Voucher de *Passiflora ambigua* Hemsl.

Fuente: (El autor, 2018)

j) *Passiflora alata* Curtis.

Nombres comunes: En el Ecuador se los conoce como “Flor de la pasión” mientras que en Brasil la denominan pasionaria salvaje

Descripción: Es una enredadera cuyo tallo es redondo, las flores son de color morado, las hojas son enteras, ovada con una sola nervadura central, el fruto es de forma redonda de color amarillo con verde y las semillas son de color negro.

Fitoquímica y usos: Según Medeiros et al., (2018). esta planta contiene vitexina, es un flavonoide cuya propiedad principal es inducir a la apoptosis y suprimir el crecimiento de tumores, adicionalmente en la ganadería la cáscara es deshidratada y sirve alimentación de ganado vacuno y porcino Otahola y Vidal (2010).

Foto de *Passiflora alata* Curtis. (Flor de la pasión)

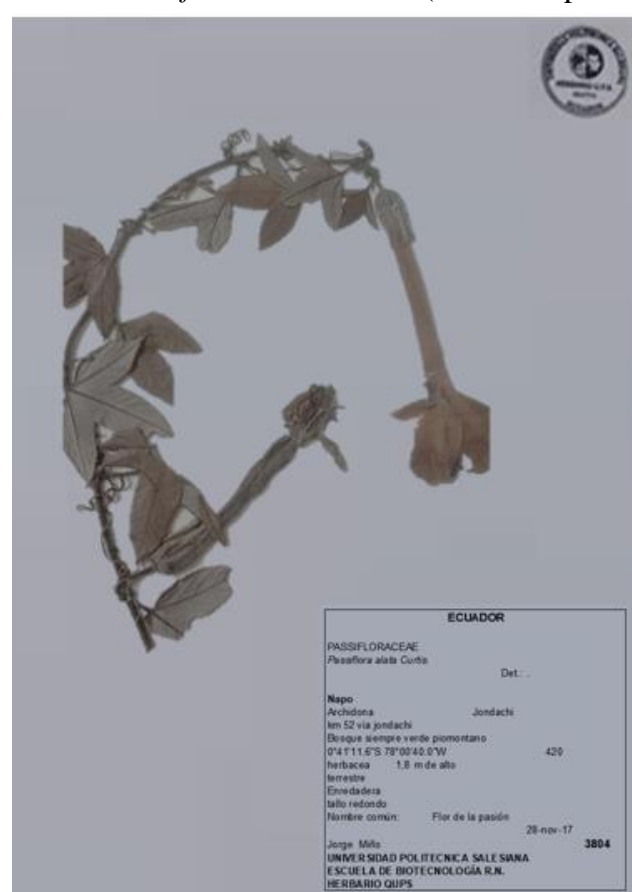


Figura 12. Voucher de *Passiflora alata* Curtis.
Fuente: (El autor, 2018)

k) *Passiflora macrophylla* Spruce ex Mast.

Nombres comunes: En el Ecuador se los conoce como “sodiro”, “maracuja silvestre”

Descripción: Es una liana con tallo angulado, cuyas flores son de color blanco, las hojas trilobadas con el margen aserrado, el fruto es de forma es una baya de color verde y las semillas son de color negro

Fitoquímica y usos: según Pinduisaca (2016), esta planta contiene apigenina es un flavonoide cuya acción es de proteger al organismo de otras enfermedades las cuales son producidas por el estrés oxidativo

Foto de *Passiflora macrophylla* Spruce ex Mast. (Sodiro)

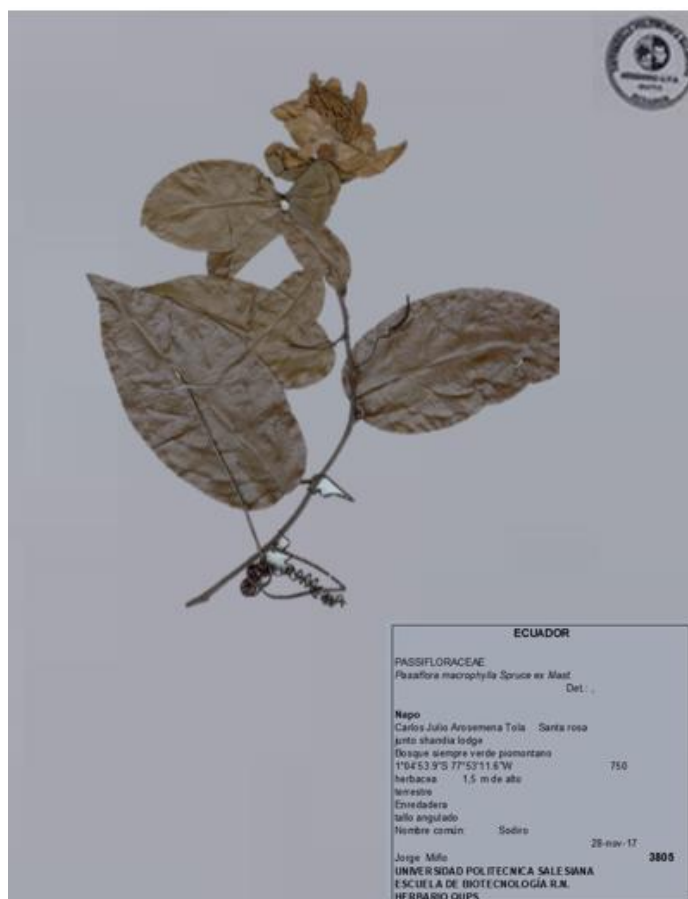


Figura 13. Voucher de *macrophylla* Spruce ex Mast.
Fuente: (El autor, 2018)

l) *Passiflora tryphostemmatoides* Harms

Nombres comunes: En el Ecuador se los conoce como “badea de monte” mientras que en Brasil la denominan “maracujá grande”, “parcha granadina”

Descripción: Trepadora cuyo tallo rectangular, las flores tienen poseen una tonalidad verde mientras que los sépalos y pétalos son de color amarillo, las hojas son trilobadas sus frutos son verde oscuro ovalado y las semillas son de color negro.

Fitoquímica y usos: Según Peñaherrera et al., (2016), esta planta contiene retinol, es un antioxidante que actúa como un potente antiinflamatorio, adicionalmente, El aceite proveniente de la semilla, puede usarse en la fabricación de barnices. Otahola y Vidal (2010).

Foto de *Passiflora tryphostemmatoides* Harms
(Badea de monte)

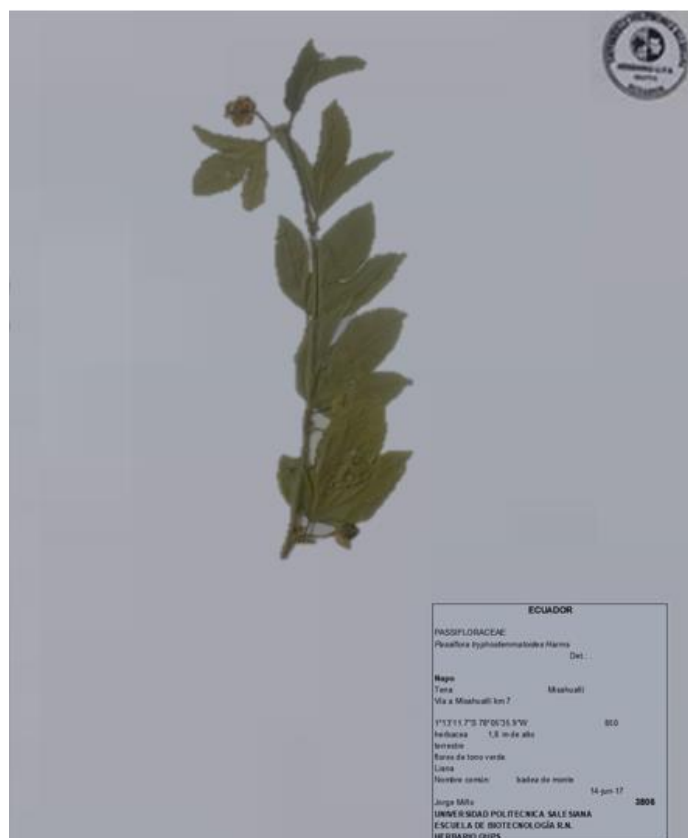


Figura 14. Voucher de *Passiflora tryphostemmatoides* Harms
Fuente: (El autor, 2018)

3.1.2 Georreferenciación

Se realizó la georreferenciación de las especies del género *Passiflora* presentes en las provincias de Pichincha, Tungurahua, Cotopaxi, Santo Domingo de los Tsáchilas, Napo, Manabí, en la siguiente figura se muestra la distribución de las especies que no se encuentran en la zona de colección pero se encuentran en la región norte del Ecuador para ello se añaden 6 especies del género *Passiflora* registradas en la base de datos Tropicos.

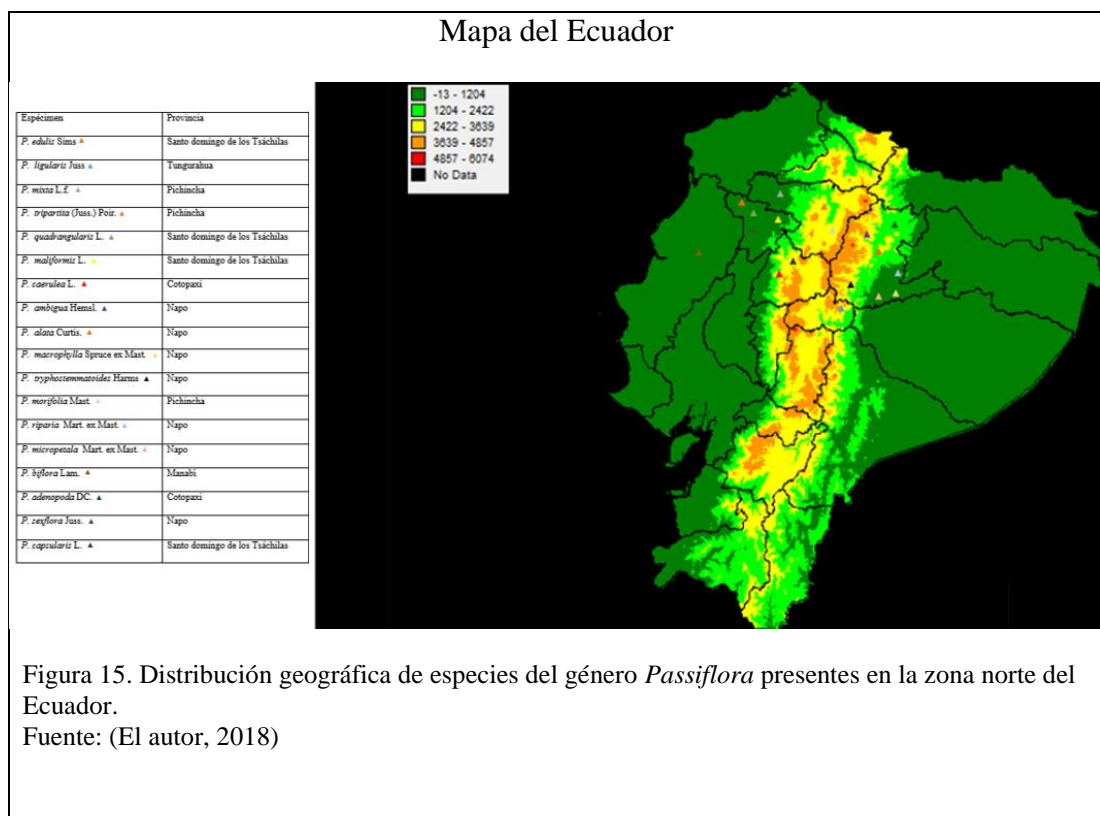
Tabla 2

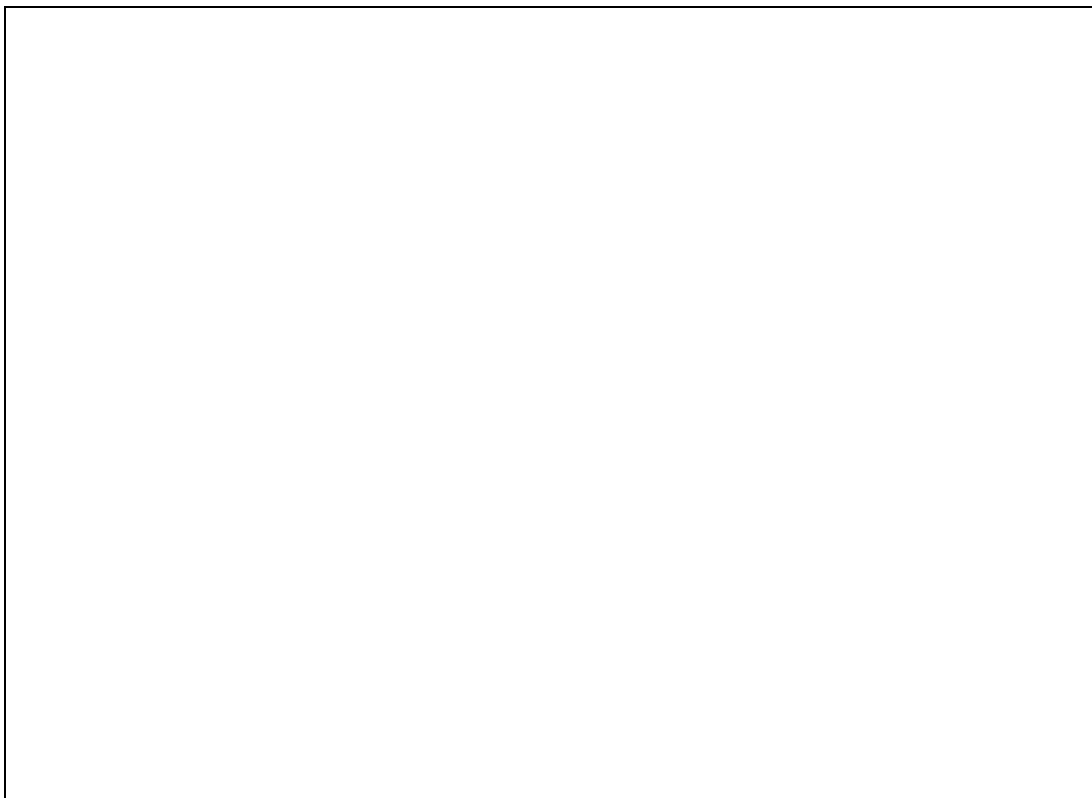
Listado de las especies que no se encuentran en la zona de colección del género *Passiflora* para este estudio

| Provincia | Espécimen | Altura (m.s.n.m) | Coordenadas |
|--------------------------------|--|------------------|------------------------|
| Napo | <i>Passiflora riparia</i> Mart. ex Mast. | 650 | 00°54'28"S 077°49'34"W |
| Napo | <i>Passiflora micropetala</i> Mart. ex Mast. | 400 | 01°04'S 077°36'W |
| Napo | <i>Passiflora sexflora</i> Juss. | 520 | 00°27'S 077°53'W |
| Cotopaxi | <i>Passiflora adenopoda</i> DC. | 2200 | 00°24'S 078°58'W |
| Manabí | <i>Passiflora biflora</i> Lam. | 600 | 01°34'S 080°40'W |
| Santo Domingo de Los Tsáchilas | <i>Passiflora capsularis</i> L. | 620 | 00°14'38"S 079°19'26"W |

Nota: Especímenes del género *Passiflora*, presentes en la región norte del Ecuador, registrados en la base de datos Tropicos.

Fuente: (El autor, 2018)





Como se observa en la figura 15 en la Provincia de Pichincha se encontró las siguientes especies *Passiflora mixta* L.f, *P. tripartita* (Juss.) Poir. y *P.morifolia* Mast. En su georreferenciación marca un piso altitudinal superior a 2900 m.s.n.m hasta los 3550 m.s.n.m la formación vegetal de estas especies corresponde a Bosque neblina montano alto; estos datos comparados con el trabajo de Acosta, (1977). Fitogeografía y vegetación de la provincia de Pichincha señala que *P. mixta* L.f, y *P. tripartita* (Juss.) Poir se encuentran distribuidas en pisos altitudinales superior a 3000 m.s.n.m

En la provincia de Cotopaxi se halla *P. caerulea* L. cuyo piso altitudinal es de 3178 m.s.n.m su formación vegetal es Bosque siempre verde montano alto, comparado con el trabajo de Valencia, Cerón, Palaio, y Sierra, (1999). Formaciones Naturales en la sierra del Ecuador recolectaron la especie *P. caerulea* L.en una altitud de 3200 m.s.n.m, mientras que *P. adenopoda* su

piso altitudinal es de 2200 m.s.n.m su formación vegetal corresponde a Bosque pluvial montano bajo.

Por otro lado en la Provincia de Tungurahua se encontró *P. ligularis* Juss, su georreferenciación marca un piso altitudinal alrededor de 1800 m.s.n.m su formación vegetal es Bosque siempre verde montano bajo en galería estos datos comparados con el trabajo de Vargas, Neil, Asansa, Freire, y Narváez, (2000). Vegetación y flora del Parque Nacional Llanganates señala que *P. ligularis* Juss se encuentra en esta formación vegetal

En el centro-norte de la región litoral en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas se ubican las siguientes especies *Passiflora edulis* Sims, *P. quadrangularis* L., *P. maliformis* L, *P. capsularis* L. su georreferenciación marca un piso altitudinal superior a los 500 m.s.n.m hasta 850 m.s.n.m; su formación vegetal es Bosque siempre verde piemontano, por otro lado En la región litoral en la provincia de Manabí se halla *P. biflora* Lam. su georreferenciación marca un piso altitudinal de 600 m.s.n.m; sus formaciones vegetal corresponden bosque semideciduo piemontano comparado con el trabajo de Cerón y Valencia (1999). Formaciones naturales del costa del Ecuador las especies se encuentran dentro de esa formación vegetal describe que estas especies se encuentran en regiones piemontano

En la región oriental en la provincia de Napo se hallan las siguientes especies *P. ambigua* Hemsl., *P. alata* Curtis., *P. macrophylla* Spruce ex Mast., *P. tryphostemmatoides* Harms, *P. riparia* Mart. ex Mast., *P. micropetala* Mart. ex Mast., *P. sexflora* Juss. su piso altitudinal es de 300 m.s.n.m hasta 900 m.s.n.m su formación vegetal es Bosque siempre verde piomontano comparado con el trabajo de Galeas, Guevara, Medina, Chinchero, y Herrera,

(2013). Sistema de clasificación de Ecosistemas del Ecuador Continental recolecto la especie *P. macrophylla* Spruce ex Mast, *P. tryphostemmatoïdes* Harms y *P. sexflora* Juss, en una altitud de 750 m.s.n.m

El género *Passiflora*, se encuentra distribuido en altitudes desde el nivel del mar hasta altitudes superiores a 3.000 m.s.n.m.; Según el estudio realizado por Carvajal et al., (2011) sobre la importancia del género *Passiflora* comenta que la mayor riqueza en especies se encuentra en las regiones moderadamente cálidas y templadas, entre 400 y 2.800 m.s.n.m. se puede visualizar los mismos resultados ya que en el mapa descrito en este trabajo la mayor abundancia de especies se encuentran en esos pisos altitudinales.

3.2 Identificación molecular

3.2.1 Extracción de ADN

Se obtuvo ADN de las 12 muestras colectadas mediante el método Doyle y Doyle modificado, las cadenas obtenidas tienen una longitud de banda mayor a 5000 pb el tamaño fue determinado mediante comparación con el marcador molecular “Lader O’Gener ruler” con un rango de 0.1 hasta 5 kb como se muestra en la figura 13, este resultado es similar al obtenido por Rivas y Salazar (2017), quienes estudiaron el género *Ocotea*, y obtuvieron ADN total con una longitud de banda mayor a 5000 pb.

Gel de electroforesis de ADN

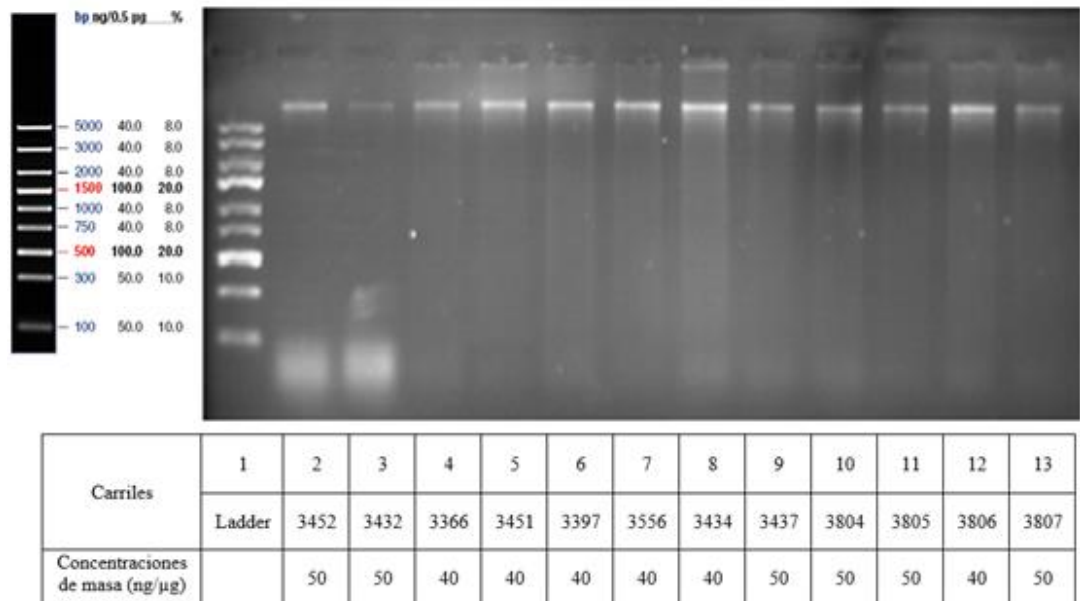


Figura 16. Electroforesis del ADN total de las especies colectadas del género *Passiflora*

Nota: En las muestras obtenidas no se observó degradación del ADN, las muestras 3452 y 3432 presentaron pequeñas cantidades de contaminación consistente en trazas de ARN, fenoles y polisacáridos. La concentración de las muestras tuvo un promedio de 40 ng/μg.

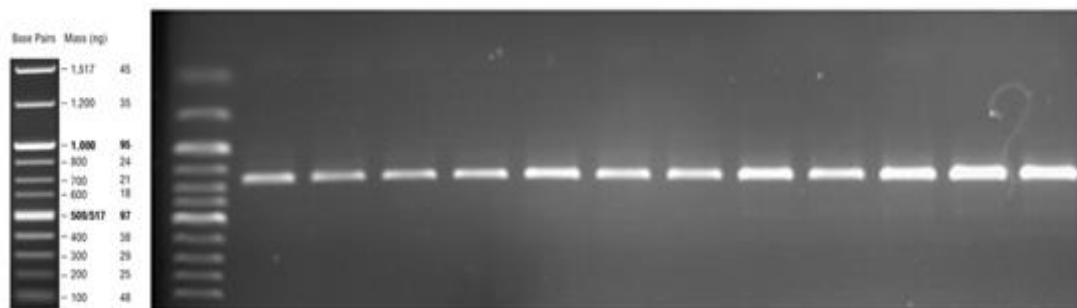
Fuente: (El autor, 2018)

3.2.2 Amplificación del segmento *matK* de las especies colectadas mediante la técnica PCR convencional.

La amplificación se desarrolló mediante la técnica descrita por Cauz et al., (2017)

La longitud de las moléculas de ADN presentan un promedio de 765 pb (ver figura 17), en comparación con el trabajo de Mazo (2011), referente a estudios de Exsicados de Orquídeas, obtuvo segmentos con 730 pb para el gen *matK*.

Gel de electroforesis de productos PCR



| Carriles | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|---------------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Ladder | 3452 | 3432 | 3366 | 3451 | 3397 | 3556 | 3434 | 3437 | 3804 | 3805 | 3806 | 3807 |
| Concentraciones de masa (ng/μg) | | 95 | 95 | 95 | 95 | 95 | 95 | 95 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 |

Figura 17. Gel electroforético del producto PCR del segmento *matK*, de especies colectadas del género *Passiflora*.

Nota: En el gel electroforético se puede observar que existe bandas de un tamaño aproximado a 700-800 pb y una concentración promedio de 95 ng/μg.

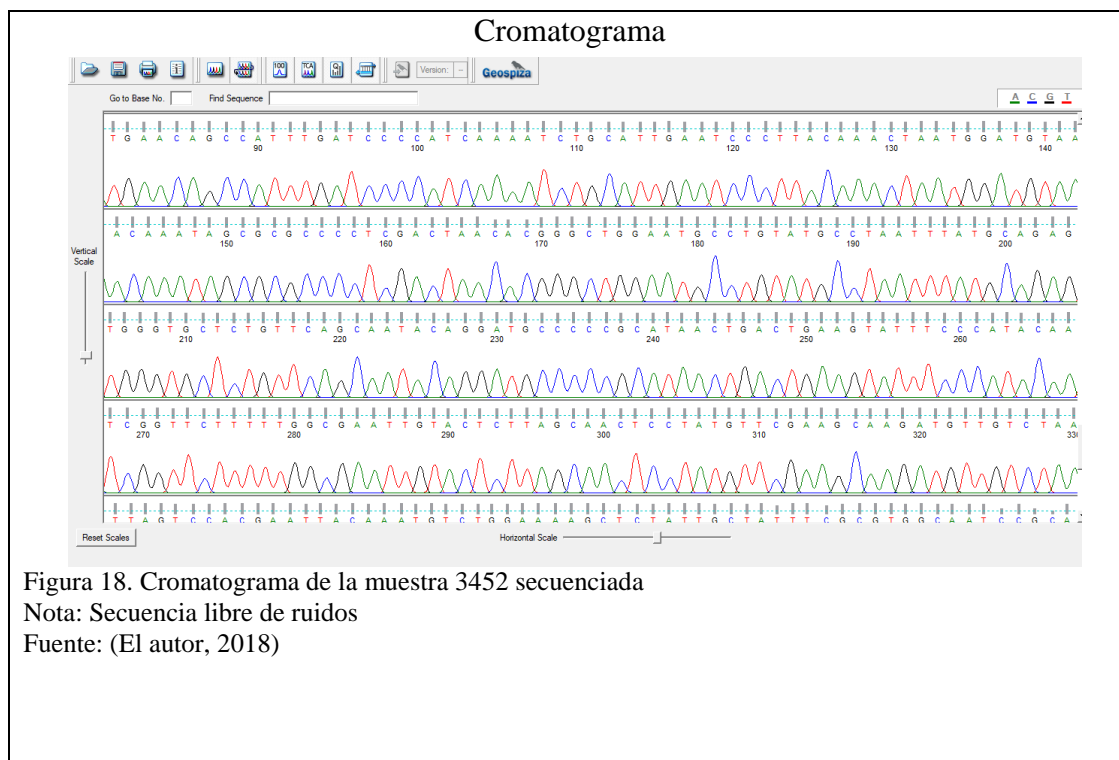
Fuente: (El autor, 2018)

3.2.3 Secuenciación de las especies colectadas

Los productos PCR fueron secuenciados por el método de Sanger en la empresa MacroGen, se obtuvieron diferentes tamaños de los fragmentos de *matK* en cada especie debido que al momento de secuenciar arrojan diferentes tamaños pero no superan los datos esperados es decir no son superiores a 765pb.

3.2.4 Análisis bioinformáticos

Se analizaron las 12 muestras obteniéndose un 97 % de aceptabilidad es decir los picos del cromatograma tienen poco ruido dando como resultado secuencias de buena calidad, las secuencias se visualizan mediante cromatogramas (figura 18), éstos fueron analizados mediante el programa Finch TV, el cual mostró buen nivel de aceptación por el bajo ruido que presentan, similar al mostrado por Sol-Church y Frenck, (2014), en su libro guía de secuencias que sugiere aceptar muestras a partir del 95 %.



3.2.5 Identificación de secuencias por medio del software Blast y Boldsystems

Una vez validadas las secuencias se procedió a identificar las secuencias amplificadas del segmento *matK*, estas fueron analizadas con el software Blast, como resultado se obtuvo la identidad de las especies: *Passiflora edulis*, *P. quadrangularis*, *P. actinia*, *P. caerulea*, *P. maliformis*, *P. quadrangularis*, *P.aurantioides*, *P. cincinnata* y *Passiflora* spp. con una identidad por encima del 98 %, en contraste con, *P. adenopoda* y *P. gardneri* presento una identidad del 94 % siendo muy bajo pero estas especies se encuentran en el mismo género.

Las secuencias también fueron analizadas con el software Boldsystem, el cual no dio resultados iguales o mayores al 98 % de identidad, lo que nos indica que no tiene registros de estas especies en su banco de datos.

Tabla 3

Resultados de identidad de especies colectadas

| Número de colección | BLAST | | BOLDSYSTEMS | |
|---------------------|----------------------------------|---------------|-----------------------------------|---------------|
| | Espécimen | Identidad (%) | Espécimen | Similitud (%) |
| 3432 | <i>Passiflora edulis</i> | 98 | <i>Passiflora glandulosa</i> | 84.15 |
| 3366 | <i>Passiflora caerulea</i> | 98 | <i>Passiflora quadrangularis</i> | 88.85 |
| 3452 | <i>Passiflora adenopoda</i> | 94 | <i>Passiflora adenopoda</i> | 94.56 |
| 3451 | <i>Passiflora</i> spp. Tokuoka | 98 | <i>Passiflora</i> spp. Tokuoka | 86.50 |
| 3397 | <i>Passiflora quadrangularis</i> | 99 | <i>Passiflora quadrangularis</i> | 84.05 |
| 3556 | <i>Passiflora actinia</i> | 98 | <i>Passiflora</i> spp. | 97.86 |
| 3434 | <i>Passiflora caerulea</i> | 98 | <i>Passiflora ambigua</i> | 92.21 |
| 3437 | <i>Passiflora maliformis</i> | 99 | <i>Passiflora glandulosa</i> | 94.47 |
| 3804 | <i>Passiflora quadrangularis</i> | 100 | <i>Passiflora quadrangularis</i> | 75.56 |
| 3805 | <i>Passiflora gardneri</i> | 94 | <i>Passiflora menispermifolia</i> | 82.95 |
| 3806 | <i>Passiflora aurantioides</i> | 100 | <i>Passiflora aurantioides</i> | 91.84 |
| 3807 | <i>Passiflora cincinnata</i> | 99 | <i>Passiflora murucuja</i> | 81.57 |

Nota: Resultados de identidad y de especímenes arrojados por medio de las herramientas Blast y Boldsystem

Fuente: El autor, (2018)

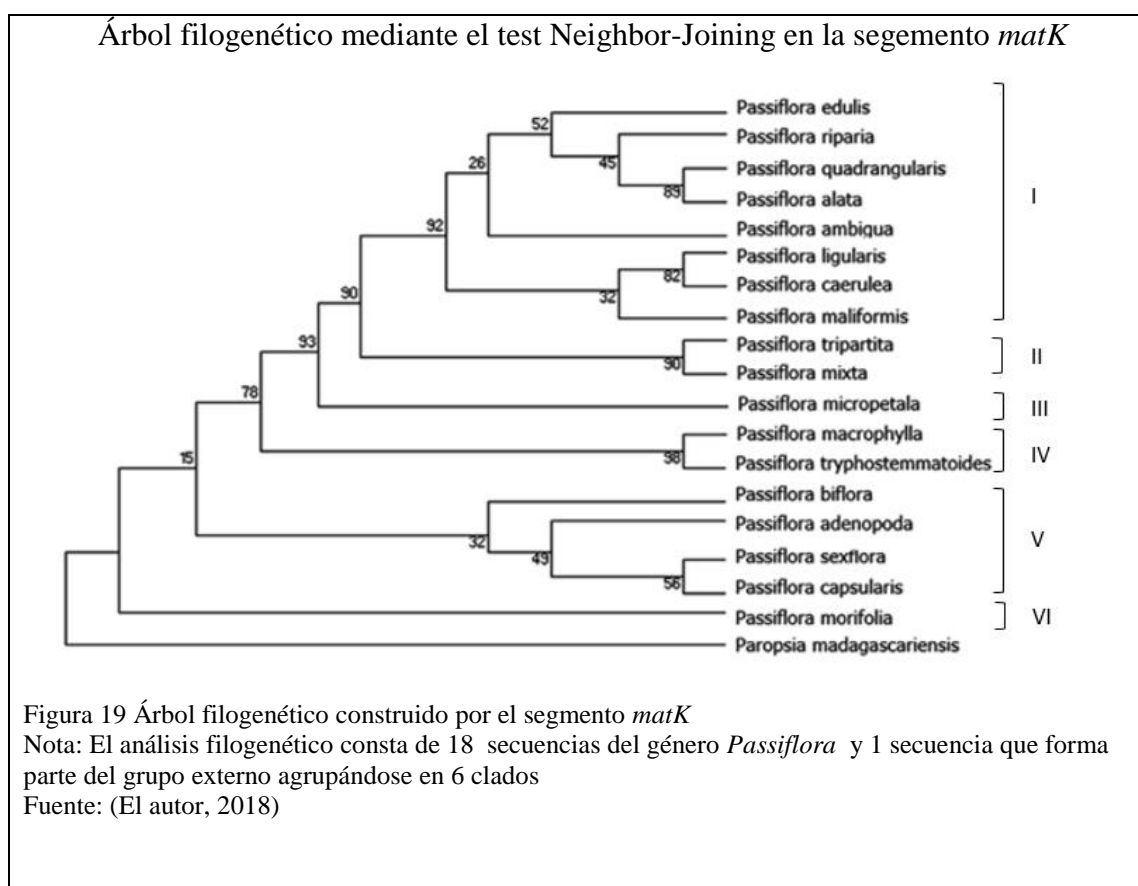
3.3 Filogenia

3.3.1 Filogenia en base al marcador *matK*

El árbol filogenético se construyó a partir de 18 secuencias de las cuales 12 fueron especies colectadas y 6 se obtuvieron de la base de datos Gene Bank; como se observa en la figura 19, el árbol muestra cinco clados para el género *Passiflora*, incluyendo una especie de referencia perteneciente a un grupo externo.

Existen 16 valores estadísticos de los cuales 8 están en un rango superior al 90 % es decir que su verosimilitud es alta, en base a esta información se formaron los siguientes grupos:

- Clado (I) incluye a: *Passiflora edulis*, *P. riparia*, *P. quadrangularis*, *P. alata*, *P. ambigua*, *P. ligularis*, *P. caurelea*, *P. maliformis*,
- Clado (II) incluye a: *P. tripartita* y *P. mixta*.
- Clado (III) incluye a: *P. micropetala*.
- Clado (IV) incluye a: *P. macrophylla*, *P. tryphostemmatoides*
- Clado (V) *P. biflora*, *P. adenopoda*, *P. sexflora*, *P. capsularis*.
- Clado (VI) *Passiflora morifolia*.



Comparando estos resultados con los obtenidos por Yockteng Y Nadot, (2004) en su trabajo de “Filogenia Infragenérica en *Passiflora*”, encontramos similitud y coherencia en la distribución de los grupos (ver anexo 4).

En contraste Tokuoka, (2012), determinó que *Passiflora biflora* y *P. adenopoda* forma un grupo vecino al clado 1, mientras que en este estudio se los ubica en el grupo IV. Además la especie *P. Ambigua* Yockteng y Nadot (2004), la ubican en el cuarto grupo, en este estudio se ubica en el grupo 1.

En base a este árbol se determina que el grupo 1 es el más evolucionado mientras que el grupo 5 es el más antiguo o basal, representado por la especie *P. morifolia* presente en la provincia de Pichincha, esta puede ser la zona de dispersión del género.

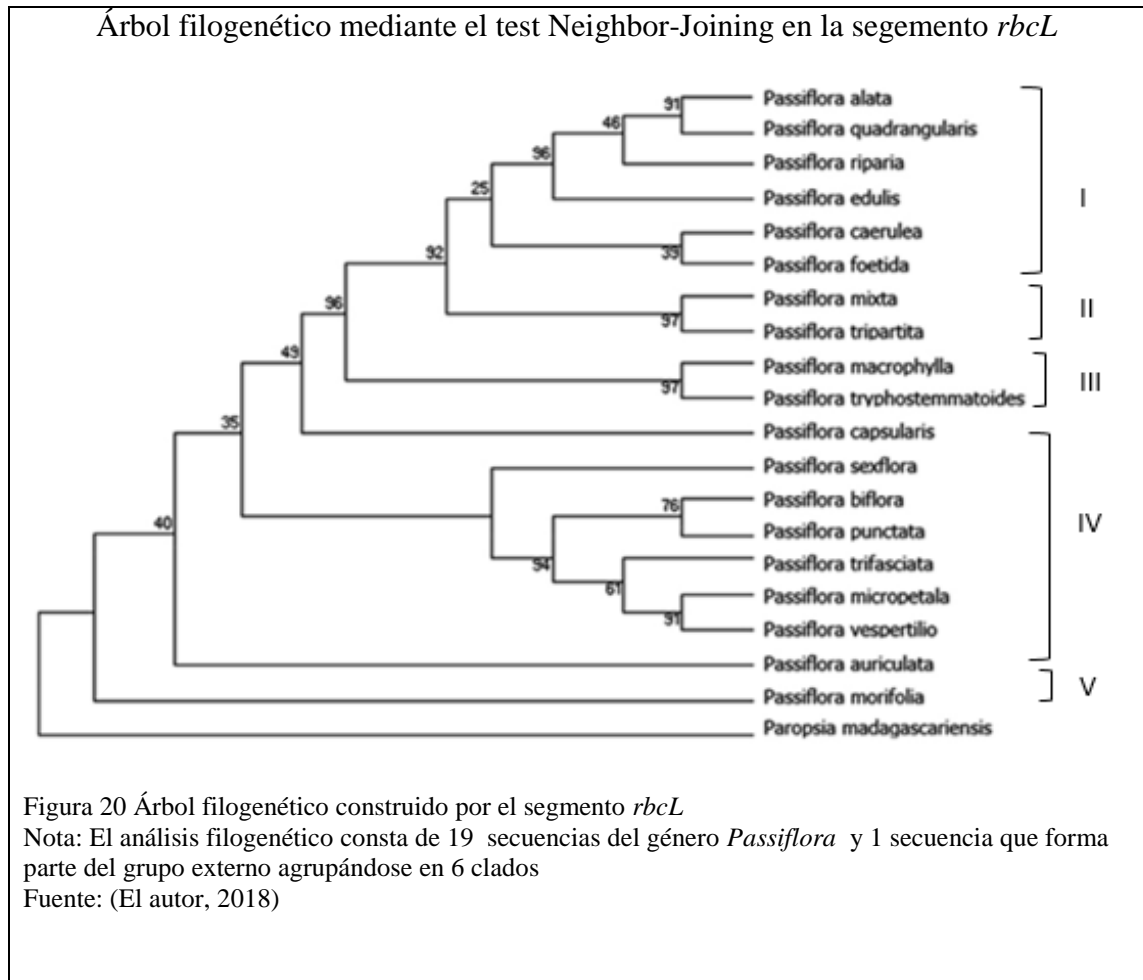
3.3.2 Árbol Filogenético por medio del marcador *rbcL*

El árbol filogenético se construyó con 19 secuencias del marcador *rbcL* de especies del género *Passiflora* presentes en Ecuador, estas secuencias fueron descargadas de la Biblioteca virtual Gene Bank; como se observa en la figura 20, el árbol muestra cinco clados, incluye una especie de referencia perteneciente a un grupo externo.

Existen 18 valores estadísticos de los cuales 7 están en un rango superior al 90 % es decir que su verosimilitud es significativa, se evidencia los siguientes clados:

- Clado (I) consta de: *Passiflora alata*, *P. caerulea*, *P. edulis*, , *P. riparia*,
P. quadrangularis, *P. foetida*
- Clado (II) consta de: *P. tripartita* *P. mixta*
- Clado (III) consta de: *P. macrophylla*, *P. tryphostemmatoides*

- Clado (IV) consta de: *P. capsularis*, *P. auriculata*, *P. biflora*, *P. micropetala*, *P. punctata*, *P. sexflora*, *P. trifasciata*, *P. vespertilio*
- Clado (V) consta de: *P. Morifolia*



Comparando estos resultados con los obtenidos por Muschner, Zamberlan, Bonatto, y Freitas, (2012) en su trabajo de “Filogenia, biogeografía y tiempos de divergencia en *Passiflora*” los grupos se distribuyen de forma similar, se estructuran 5 clados siendo el más antiguo el clado V representado por *P. morifolia*, y el grupo más moderno el Clado 1 representado por *P. alata* y *P. quadrangularis*.

En contraste con los resultados obtenidos por Muschner et al., (2012), agrupa a *P. punctata*, *P. biflora*; *P. vespertilio* y *P. micropetala* en el segundo clado en presente trabajo se ubican en el cuarto clado. Además *P. sexflora* y *P. capsularis* según Bernal et al. (2014) se ubican en cuarto clado, en este trabajo *P. capsularis* se ubica en un grupo vecino.

3.3.3 Árbol Filogenético concatenado los marcadores *matK* y *rbcL*

El árbol filogenético se construyó a partir de las secuencias del gen *matK* y *rcbL* concatenadas, pertenecientes a 14 especies del género *Passiflora*, como se observa en la figura 21

- Clado (I) consta de: *Passiflora edulis*, *P. quadrangularis*, *P. alata*, *P. riparia*, *P. mixta*, *P. tripartita* y *P. caerulea*
- Clado (II) consta de: *P. macrophylla*, *P. tryphostemmatoides* y *P. micropetala*
- Clado (III) consta de: *P. sexflora*, *P. capsularis* y *P. biflora*
- Clado (IV) consta de: *P. morifolia*

Árbol filogenético mediante el test Neighbor-Joining concatenadno las secuencias

matK y *rbcL*

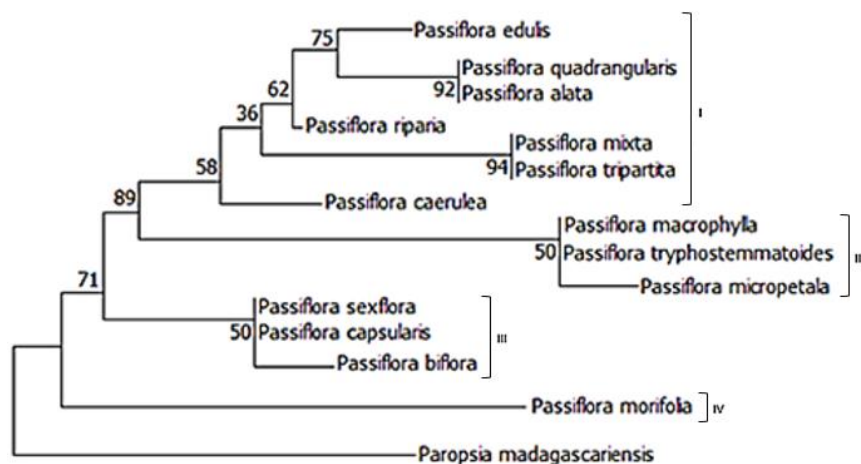


Figura 21. Árbol filogenético concatenado por los marcadores *matK* y *rbcL*

Nota: El análisis filogenético consta de 11 secuencias del género *Passiflora* y 1 secuencia que forma parte del grupo externo agrupándose en 5 clados

Fuente: (El autor, 2018)

El árbol concatenado por los segmentos *matK* y *rbcL* tiene una conformación similar al árbol realizado por Yockteng y Nadot, (2004), por medio del segmento *matK*, es decir no existe variación en la conformación de grupos, solo presentan ligeros cambios en los soportes de rama, comparando estos resultados con los obtenidos encontramos similitud y coherencia en la distribución de los grupos (ver anexo 4).

El siguiente árbol está conformado por cuatro clados el clado 1 siendo parte *P. edulis*, *P. quadrangularis*, *P. alata*, *P. riparia*, *P. mixta*, *P. tripartita* y *P. caerulea*, siendo estos los más modernos, como se observa en todos los árboles en este estudio se determina que el clado 4 es el menos evolucionado y está representado por *P. morifolia*

En un estudio realizado por Muschner et al., (2003) arroja el mismo resultado la parte basal del árbol filogenético, está conformado *P. morifolia* es decir se alejó tempranamente del grupo, su característica que la hace diferente a las demás es el fruto de color azul

Se eligió como grupo externo a *Paropsia madagascarensis* comparado con el trabajo de Ramaiya, Bujang, y Zakaria, (2014) utilizó esta especie ya que es cercana al género *Passiflora*.

4. Conclusiones

- Se colectaron 12 de especies distribuidas en 5 provincias, la mayor abundancia de especies del género *Passiflora* se encuentra en las regiones cuyos pisos altitudinales van desde entre 400 y 2800 m.s.n.m estas fueron identificadas a nivel de especie, presentan características comunes como son los tallos glabros, zarcillos, semillas planas provistas de una cutícula siendo la característica principal es que todas las semillas son de negro
- Se probó el método de ADN BARCODING para la identificación molecular del género *Passiflora* siendo un método efectivo y moderno logrando clasificar a las especies de mejor manera mediante el segmento *matk* presentando muchos polimorfismos permitiendo la discriminación de especies.
- El árbol filogenético concatenado elaborado con los segmentos *matK* y *rbcL*, estableció clados más precisos, se obtuvo una gran similitud con el árbol realizado por el segmento *matK*, se denoto que *P. morifolia* siendo el punto de dispersión del género en la provincia de Pichincha es la especie menos evolucionada mientras que *P. edulis*, *P. quadrangularis* y *P. alata* son la especies más moderna del género sus puntos de diversificación son en las zonas tropicales

5. Recomendaciones

- Ampliar el estudio de las especies de este género presentes en la zona sur de Ecuador cuyos pisos altitudinales se encuentren entre 400 y 2800 m.s.n.m. donde se encontró mayor abundancia
- Mantener el tejido colectado a baja temperatura después del corte, en el almacenamiento y procesamiento, además se recomienda incluir β -mercaptoetanol en el procedimiento de extracción del ADN con el fin de bloquear a los polifenoles.
- Incrementar el estudio a todas las especies del género *Passiflora* presentes en Ecuador con el fin de establecer la filogenia completa de este género y establecer los puntos de diversificación de este grupo, esto nos dará una imagen de la historia evolutiva de la flora en nuestro país.

6. Referencias

- Acosta, M. (1977). Fitogeografía y vegetación de la provincia de Pichincha. Consejo Provincial de Pichincha Quito.
- Azofeifa, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–222. <https://doi.org/10.15517/am.v17i2.5163>
- Bello, N. (2001). *Desarrollo de marcadores moleculares en el avestruz (Struthio Camelus)*. Universidad Autónoma de Barcelona. Retrieved from <http://ddd.uab.cat/pub/tesis/2001/tdx-1116101-143451/nbp1de4.pdf>
- Benitez, O. (2004). *Contribución al estudio de la filogenia molecular de los peces de la familia gerreidae en México*. Instituto Politécnico Nacional.
- Bohórquez, M., Araque, E., y Pacheco, J. (2012). Respuesta Germinativa y Micropropagación de Cóngolo (*Passiflora maliformis* var. *Pubescens*). Tunja.
- Boldsystem. (2018a). Boldsystem. Retrieved January 11, 2018, from <http://www.boldsystems.org/>
- Boldsystem. (2018b). Boldsystem. Retrieved January 11, 2018, from http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine
- Bonilla, M., Aguirre, A., y Agudelo, O. (2015). Morfología de *Passiflora*: una guía para la descripción de sus especies. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1), 91–110.
- Burnie, G., y Cheers, G. (2006). *Botánica Guía ilustrada de plantas Más 10.000 especie de la A a la Z y cómo cultivarlas*. (2006 Tandem Verlag GmbH, Ed.) (Könemann). Barcelona.
- Cadavid, I. (2013). Tipificación molecular y separación de especies de plantas del subgénero *Leptostemonum* (Solanaceae: *Solanum*), usando regiones barcode, 189. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/9516/>

- Carvajal, L., Turbay, S., Rojano, B., Álvarez, L., Restrepo, S., Álvarez, J., ... Sánchez, N. (2011). Algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), 354–363.
- Cauz, L., Munhoz, C., Rodde, N., Cauet, S., Santos, A., Penha, H., ... Vieira, M. (2017). The Chloroplast Genome of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) Assembled from Long Sequence Reads: Structural Organization and Phylogenomic Studies in Malpighiales. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00334>
- Cerón, C. (2015). *Bases para el estudio de la flora ecuatoriana*. (Universitaria, Ed.). Quito.
- Cerón, C., Valencia, V., y Sierra, R. (1999). Formaciones naturales del costa del Ecuador. Proyecto INEFAN/GEF BIRF y EcoCiencia Quito.
- Charco, M. (2017). *Evaluación del extracto hidroalcohólico de Passiflora tripartita y pre formulación de jarabe*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Chávez, L. (2017). *Evaluación toxicológica aguda de los extractos etanólicos de hojas de passiflora edulis y Passiflora quadrangularis sobre rattus norvegicus por vía oral*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Chi, W. (2013). *Análisis filogenético de Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid.* Oviedo.
- CIATOX. (2015). Lista de plantas intoxicaciones causadas por plantas. Ministerio de Salud Pública.
- Cires, E. (2010). *DNA Barcoding: una nueva herramienta para identificar plantas*. Oviedo.
- Contreras, A., Cuevas, C., Goeyenechea, I., y Iturbe, U. (2007). *La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad*. (UAEH, Ed.). Pachuca.
- Cooper, G., y Hausman, R. (2009). *La Célula* (Marbán). Madrid.

- Deginani, N. (2001). Las especies Argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). *Darwiniana*, 39(1–2), 43–129. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432000000100006>
- Escobar, C., Murillo, L., y Soto, J. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et Technica*, 3(49), 116–121. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- FinchTV. (2006). FinchTV. Retrieved from http://descargar.cnet.com/FinchTV/3000-2054_4-10289087.html
- Flores, J., Canto, G., y Flores, A. (2001). Plantas de la flora yucatanense que provocan alguna toxicidad en el humano. *Revista Biomédica*, 12(2), 87.
- Freire, A. (2004). *Botánica Sistemática Ecuatoriana Missouri Botanical Garden* (FUNDACYT,). Missouri.
- Galeas, R., Guevara, E., Medina, B., Chinchero, M., y Herrera, X. (2013). Sistema de clasificación de Ecosistemas. MAE.
- García, H. (2017). Actividad antioxidante in vitro de *Passiflora* “puro puro” procedente de los distritos de Usquil, Charat y Huaranchal.
- Garibyan, L., y Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Gonzales, M. (2008). *Técnicas de laboratorio en biología celular y molecular*. (AGT, Ed.) (Primera). México D.F.
- Hansen, A., Gilbert, A., y Jansen, R. (1999). Origin and evolutionary relationships in *Passiflora* (p. 73).
- Hollingsworth, P., Forrest, L., Spouge, J., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., ... Little, D. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12794–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>

- Imig, D. (2013). *Estudo Taxômico da família Passifloraceae Juss. no Distrito Federal, Brasil*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Instituto Nacional de Biodiversidad. (2008). Protocolo de manejo de colecciones de plantas vasculares proyecto “desarrollando capacidades compartiendo tecnología para la gestión de la biodiversidad en Centroamérica, 5–7.
- Jørgensen, P., Muchhala, N., y MacDougal, J. (2012). *Passiflora unipetala*, a new bat-pollinated species of *Passiflora* supersect. *Tacsonia* (Passifloraceae). *Novon*.
- Krosnick, S., Ford, A., y Freudenstein. (2009). Taxonomic Revision of *Passiflora* subgenus *Tetrapathea* including the Monotypic Genera *Hollrungia* and *Tetrapathea* (Passifloraceae), and a New Species of *Passiflora*. *Systematic Botany*.
- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., ... Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2923–2928. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709936105>
- Leal, C. (2003). *Organogénesis in vitro a partir de discos de hoja de Passiflora mollissima hbk bailey (curuba) infectados con Agrobacterium tumefaciens*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., y Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (62), 1–5. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Leon, J. (2000). *Botánica de los cultivos Tropicales*. (E. IICA., Ed.) (3rd ed.). San José - Costa Rica.
- List, T. P. (2013). The Plant List. Retrieved from <http://www.theplantlist.org/>
- Loza, C. (2013). *Plan de negocios para la exportación de granadilla al mercado alemán en el periodo 2012 – 2017*. Universidad Tecnológica Equinoccial.

- Maldonado, C., Franco, M. y, Urango, L. (2015). Características nutricionales y antioxidantes de la fruta curuba larga (*Passiflora mollissima* Bailey). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*.
- Mazo, L. (2011). *Evaluación Y Comparación De 3 Protocolos De Extracción Y Amplificación Del Adn Contenido En Exsiccados De Orquídeas Conservadas En Colecciones De Herbario*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Medeiros, S., Almeida, C., Lima, D., Wohlemberg, M., Machado, F., y Massolini, M. (2018). In Vitro Antioxidant Activity of Passion Fruit (*Passiflora alata*) Extract by Different Kinds of Treatment on Rat Liver. Retrieved from <http://www.passionflow.co.uk/passiflora-passion-flower-SEM.htm>
- Morerira, F., Huising, J., y Bignell, D. (2012). Manual de biología de suelos tropicales. *Books.Google.Com*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2017). Microbiología Médica. *Aging*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Muschner, V. C., Zamberlan, P. M., Bonatto, S. L., y Freitas, L. B. (2012). Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 SUPPL.), 1036–1043. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600019>
- Muschner, V., Lorenz, A., Cervi, A., Bonatto, S., Souza-Chies, T., Salzano, F., y Freitas, L. B. (2003). A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *American Journal of Botany*, 90(8), 1229–1238. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.8.1229>
- NCBI. (2017). Blast. Retrieved January 11, 2018, from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

- NCBI. (2018). National Center for Biotechnology Information. Retrieved January 11, 2018, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Ocampo, J., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Restrepo, M., Jarvis, A., Salazar, M., y Caetano, C. (2007). Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colombiana*, 8(1), 1–45. <https://doi.org/10.1007/s10531-013-0560-y>
- Otahola, V., y Vidal, G. (2010). Efecto de las características de la estaca y la utilización de ANA en la propagación de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1), 29–35. Retrieved from <http://www.bioline.org.br/pdf?cg10004>
- Peñaherrera, E., Jerves, L., Cuzco, N., Wilches, I., León, F., y Tobar, V. (2016). Efecto antiinflamatorio de extractos metanólicos de plantas de Azuay y Loja (Ecuador) a través del modelo de peces cebra.
- Pierce, B. (2016). *Genética un enfoque conceptual*. (Panamericana, Ed.) (05 ed.).
- Pinduisaca, M. (2016). *Estudio Fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante In Vitro de hojas y flores de Passiflora ligularis*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Quezada, T. (1997). *Biología de Getta baetifica Druce y Scea semifulva Warren*. Pontificia Universidad Católica Del Ecuador.
- Rivas, P., y Salazar, P. (2017). *Comparación de la variabilidad genética de tres regiones de ADN cloroplástico y una nuclear en el ishpingo (O. quixos) proveniente de 5 provincias de la Amazonía ecuatoriana*. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito. <https://doi.org/10.20868/UPM.thesis.39079>
- Robert, E. (2004). Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

- Rogers, S., y Bendich, A. (1988). Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual. Belgium: Kluwer Academic Publishers.
- Roman, B. (2017). *Evaluación toxicológica aguda de los extractos etanólicos de hojas de Passiflora ligularis y Passiflora mixta sobre Rattus norvegicus por vía oral*. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6369/1/56T00686.PDF>
- Romero, H. (1999). *Diversidad, análisis estructural y aspectos florísticos relevantes de las lianas en una parcela de bosque muy húmedo premontano, Amazonía Ecuatoriana*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR.
- Salavarieta, P. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite Theory and Practice for the Extraction and Purification of the Oil Palm DNA. *Palmas*, 23(3), 9–17.
- Sánchez, L. (2016). *Estudio etnobotánico , macro y micro- morfológico de plantas del género Passiflora utilizadas como sedantes en la provincia de Chimborazo*. Riobamba. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4868/1/56T00612UDCTFC.pdf>
- Severin, C., Bueno, M., Dantín, F., y Giubileo, M. G. (2011). Respuesta in vitro de diferentes biotipos y explantos de *Passiflora caerulea* L . *Rev. Colomb. Biotecnol.*, XIII(1), 73–79.
- Sol-Church, K., y Frenck, J. (2014). Sequencing Guidelines. *Biomolecular Core Facility*.
- Suarez, A. (2015). *Utilización de herramientas genómicas en el estudio de la arquitectura molecular de caracteres de importancia económica en el ganado ovino*. Universidad de León.
- Tamarin, R. (2015). *Principios de genética*. (Reverté, Ed.) (Primera). Barcelona.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., y Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tapia, W. (2013). *Evaluación de tres programas de fertilización foliar complementaria luego del transplante en el cultivo de maracuyá (Passiflora edulis) var. Flavicarpa*. Valencia, Los Ríos. Universidad Central del Ecuador.
- Tillett, S. (1988). *Passionis passifloris* II Terminología. *ERNSTIA*, 48, 1–40.
- Tokuoka, T. (2012). Molecular phylogenetic analysis of Passifloraceae sensu lato (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Journal of Plant Research*. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0472-4>
- Ulmer, T., y MaCDougal, J. (2004). *Passiflora: passionflowers of the world*. Timber Press, 430p.
- Valencia, R., Cerón, E., Palaio, W., y Sierra, R. (1999). Formaciones Naturales en la sierra del Ecuador Propuesta Preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador Continental. INEFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia, Quito.
- Vargas, H., Neil, D., Asansa, M., Freire, A., y Narváez, E. (2000). Vegetación y flora del Parque Nacional Llanganates, biodiversidad en el Parque Nacional Llanganates un reporte de las evaluaciones ecológicas rápidas. EcoCiencia- Ministerio de Ambiente –Herbario Nacional del Ecuador- Museo de Ciencias Naturales- Instituto de reconstrucción rural Quito.
- Velásquez, A. (2016). *Estudio del manejo postcosecha de la badea Passiflora quadrangularis*. Universidad Técnica Del Norte.

- Wojciechowski, M., Lavin, M., y Sanderson, M. (2004). A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, 91(11), 1846–1862. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1846>
- Yockteng, R., y Nadot, S. (2004). Infrageneric phylogenies: A comparison of chloroplast-expressed glutamine synthetase, cytosol-expressed glutamine synthetase and cpDNA maturase K in Passiflora. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(1), 397–402. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00276-8](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00276-8)

7. Anexos

Anexo 1. Tabla de resultados de la extracción de ADN y Amplificación del gen *matK*

| Número de colección | Espécimen | ADN | Amplificación de la Región <i>matK</i> |
|---------------------|---|-------|--|
| 3432 | <i>Passiflora edulis</i> Sims | (+) | (+) |
| 3366 | <i>Passiflora ligularis</i> Juss | (+) | (+) |
| 3452 | <i>Passiflora mixta</i> L.f. | (+) | (+) |
| 3451 | <i>Passiflora tripartita</i> (Juss.) Poir. | (+) | (+) |
| 3397 | <i>Passiflora quadrangularis</i> L. | (+) | (+) |
| 3556 | <i>Passiflora maliformis</i> L. | (+) | (+) |
| 3434 | <i>Passiflora caerulea</i> L. | (+) | (+) |
| 3437 | <i>Passiflora ambigua</i> Hemsl. | (+) | (+) |
| 3804 | <i>Passiflora alata</i> Curtis. | (+) | (+) |
| 3805 | <i>Passiflora macrophylla</i> Spruce ex Mast. | (+) | (+) |
| 3806 | <i>Passiflora tryphostemmatoides</i> Harms | (+) | (+) |
| 3807 | <i>Passiflora morifolia</i> Mast. | (+) | (+) |

Anexo 2. Tabla de resultados de Blastn del género *Passiflora* de especies colectadas

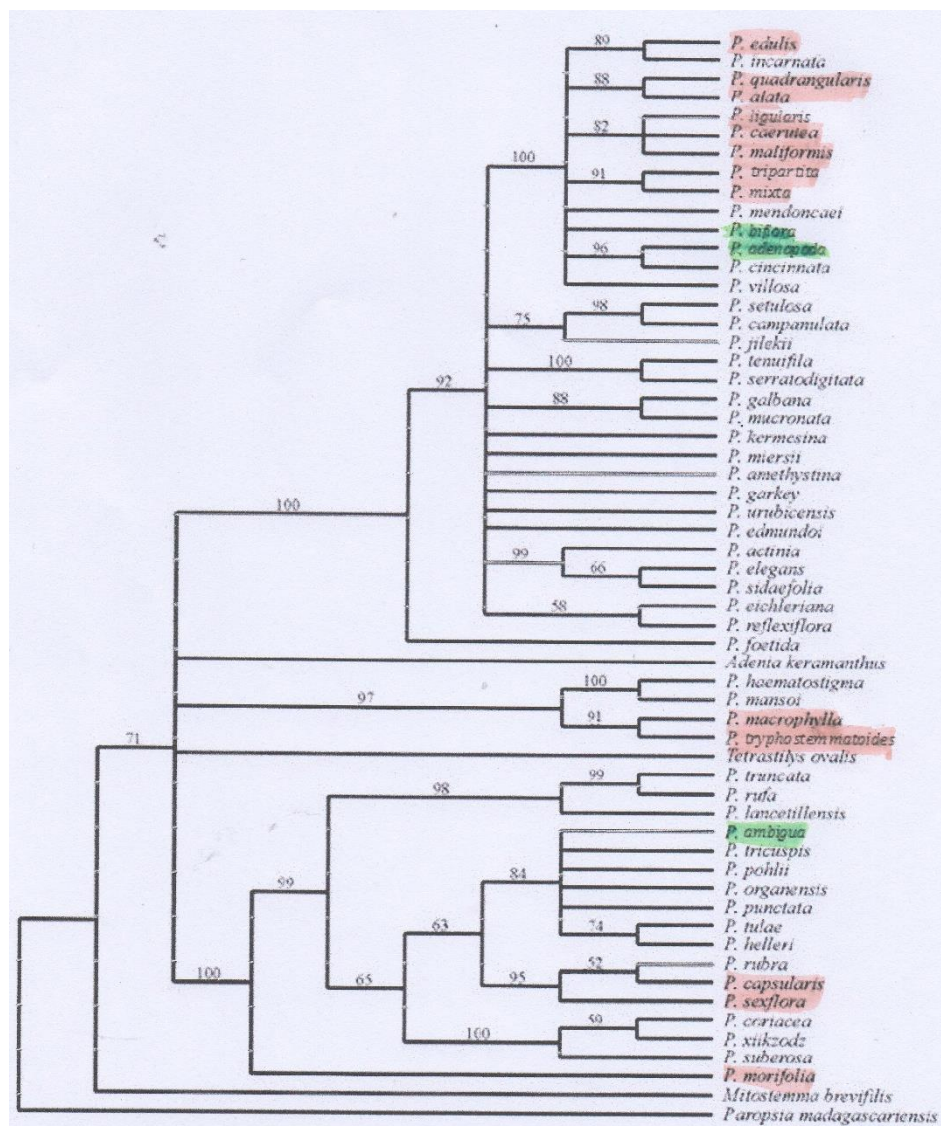
| Número de colección | Descripción | Cobertura (%) | Identidad (%) | Referencia |
|---------------------|--|---------------|---------------|---|
| 3432 | <i>Passiflora edulis</i> chloroplast, complete genome | 100 | 98 | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| 3366 | <i>Passiflora caerulea</i> voucher CPAC-MJ-14-01 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast | 81 | 97 | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| 3452 | <i>Passiflora adenopoda</i> maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast gene for chloroplast product | 89 | 94 | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| 3451 | <i>Passiflora</i> sp. Tokuoka NC196 chloroplast matK gene for maturase K, partial cds, specimen_voucher: KYO:Tokuoka NC196 | 87 | 98 | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| 3397 | <i>Passiflora quadrangularis</i> voucher K. Hansen s.n. (TEX) maturase K (matK) gene, complete cds; chloroplast | 98 | 99 | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| 3556 | <i>Passiflora actinia</i> voucher CPAC-MJ-04-01 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast | 92 | 98 | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| 3434 | <i>Passiflora caerulea</i> maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast | 97 | 98 | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| 3437 | <i>Passiflora maliformis</i> voucher CPAC-MJ-68-00 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast | 88 | 99 | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| 3804 | <i>Passiflora quadrangularis</i> chloroplast matK gene for maturase K, partial cds | 91 | 100 | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| 3805 | <i>Passiflora gardneri</i> voucher CPAC-MJ-39-01 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast | 53 | 94 | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |

| | | | | |
|------|---|----|-----|---|
| 3806 | <i>Passiflora aurantioides</i> chloroplast matK gene for maturase K, partial cds, specimen_voucher: MO:Takeuchi & Ama 16355 | 91 | 100 | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| 3807 | <i>Passiflora cincinnata</i> strain UFV chloroplast, complete genome | 74 | 99 | https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |

Anexo 3. Tabla de resultados de Boldsystems del género *Passiflora* de especies colectadas

| Número de colección | Mejor identificación | Calificación | Similitud (%) | Referencia |
|---------------------|-----------------------------------|--------------|---------------|---|
| 3432 | <i>Passiflora nitida</i> | 416 | 82.77 | http://boldsystems.org/index.php/IDS_BlastRequest |
| 3366 | <i>Passiflora quadrangularis</i> | 436 | 88.85 | http://boldsystems.org/index.php/IDS_BlastRequest |
| 3452 | <i>Passiflora adenopoda</i> | 523 | 94.56 | http://boldsystems.org/index.php/IDS_BlastRequest |
| 3451 | <i>Passiflora</i> spp. Tokuoka | 182 | 86.11 | http://boldsystems.org/index.php/IDS_BlastRequest |
| 3397 | <i>Passiflora glandulosa</i> | 444 | 82.98 | http://boldsystems.org/index.php/IDS_BlastRequest |
| 3556 | <i>Passiflora</i> spp. | 507 | 97.86 | http://boldsystems.org/index.php/IDS_BlastRequest |
| 3434 | <i>Passiflora caerulea</i> | 493 | 83.10 | http://boldsystems.org/index.php/IDS_BlastRequest |
| 3437 | <i>Passiflora glandulosa</i> | 544 | 94.47 | http://boldsystems.org/index.php/IDS_BlastRequest |
| 3804 | <i>Passiflora quadrangularis</i> | 288 | 75.56 | http://boldsystems.org/index.php/IDS_BlastRequest |
| 3805 | <i>Passiflora menispermifolia</i> | 298 | 82.95 | http://boldsystems.org/index.php/IDS_BlastRequest |
| 3806 | <i>Passiflora aurantioides</i> | 299 | 91.84 | http://boldsystems.org/index.php/IDS_BlastRequest |
| 3807 | <i>Passiflora murucuja</i> | 120 | 81.57 | http://boldsystems.org/index.php/IDS_BlastRequest |

Anexo 4. Análisis filogenético molecular de *Passifloraceae* (Malpighiales) basado en secuencias de ADN plastídicas y nucleares” Tokuoka, (2012)



Anexo 5. Filogenia, biogeografía y tiempos de divergencia en *Passiflora*
Muschner, Zamberlan, Bonatto, & Freitas, (2012)

